

原 著

マウス口腔領域の発生におけるホメオティック遺伝子産物と 分化・成長因子の発現様式

森 川 留美子¹⁾ 大 友 克 之²⁾ 永 山 元 彦¹⁾
竹 内 宏¹⁾

¹⁾朝日大学歯学部口腔病理学講座(主任:竹内 宏教授)

²⁾朝日大学歯学部外科学講座

抄録 口腔発生に関連する口咽頭弓の発生過程を胎生10日から生後2日にわたってマウスを用いて観察し、口腔諸器官は、11日胚と12日胚で原基形成期、13日胚から17日胚で原基成長期、その後の臓器完成期を経て形成されることが判明した。

これらの期間における胚細胞のホメオティック遺伝子産物と各種分化成長因子の発現様式を免疫組織化学的に観察した結果、体節の特徴付けに関連するホメオティック遺伝子産物は口咽頭弓においてもこの全期間を通じて発現され、細胞増殖性の指標となるPCNAは12日胚および17、18日胚に二相性のピークを示す発現性を示し、これと同様の発現性はNGFファミリー、EGFファミリーのリガンドとレセプターの同時発現に、またFGFファミリーの17、18日胚の発現にみられた。これに対して、TGF- β ファミリーのリガンドとレセプターの同時発現は13~15日胚に認められた。

以上の所見は、発生に直接的に関連する胎仔細胞の増殖はNGF、EGFおよびFGFファミリーによって促進され、逆にTGF- β スーパーファミリーによって抑制されること、およびTGF- β スーパーファミリーは細胞分化に関連していることが示唆された。

キーワード: 口腔発生, 鰓弓, ホメオティック遺伝子産物, 分化・成長因子

緒 言

個体発生における組織発生と型形成(形態形成)の本態は細胞の増殖と分化であり、両者は発生過程で必須の細胞形態の変化、細胞の移動、集合、細胞外物質の分泌、誘導、アポトーシス等をもたらす。このような増殖と分化に関連する主要な遺伝子群は、体軸決定遺伝子群、分節遺伝子群およびホメオティック遺伝子群である。これら遺伝子群は染色体上のある領域に集中し、発生過程に呼応して順序通り発現を行い、生体のほとんどの臓器・組織は、この順序において形成された体節から生じることが周知の通りである¹⁾。

しかし、口腔領域の各臓器・組織は体節ではなく顔面隆起の口咽頭弓に由来する。本隆起は神経提由来の細胞を混じ四胚葉性である点で三胚葉性の体節とは異なる。

本研究では、マウスを対象として、このような四胚葉性の口腔領域の組織発生と発生原基の細胞増殖と分化の様相を、体節の特徴付けに関連するホメオティック遺伝子発現物質と各種成長因子の免疫組織化学的検索の面から検討した。

材料および方法

組織学および免疫組織化学的検索はDDY系マウスの胎児マウス380匹および生後マウス190匹を用い、

本論文の要旨は、第143回岐阜歯科学会例会(平成14年2月16日,岐阜)において発表した。
(平成15年1月29日 受理)

妊娠後の胎栓形成確認時を1日として、以降胎生10日から生後2日までの11日間にわたって行った。

胎児マウスは妊娠マウスからエーテル麻酔下で外科的にとり出し、10、11日胚は全胎を、またそれ以降は頸部を切断し、それぞれを10%中性ホルマリンにて12

時間固定した。固定後、通法によりパラフィン包埋し、約 6 μ mの連続切片とした。なお切片は主として前頭断的、および一部を矢状断的に作製した。

観察では各切片にヘマトキシリン・エオジン染色 (HE染色) を施して口腔領域発生の過程を追跡し、次に、この所見で得られた主要な組織の型形成の過程における発現物質について免疫組織化学的検索を行った。なお、発生の各時期は腔栓形成確認後の算定と同時に、各時期の光顕像を成書³⁾のそれと比較することによって確認した。

免疫組織化学的検索で対象とした発現物質はホメオティック遺伝子産物と細胞増殖関連物質を含む成長因子であり、表 1 に示すように 19 種類の 1 次抗体 (すべて SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, CA, USA) を用いた。それぞれの 1 次抗体は 10mM phosphate buffered saline (PBS, pH7.4) を用いて反応および染色性が至適になるように予め希釈調製した。

反応と染色には streptavidin-biotin-peroxidase complex 法 (sABC 法) を用いた。すなわち、パラフィン切片を通法に従って脱パラフィンし、上昇エタノールで脱水した後、0.3% 過酸化水素水を含むメタノールで 20 分間内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、0.1% トリプシン溶液にて酵素処理を行った。続いて 1% ウシ血清アルブミンで 20 分間ブロッキングした後、希釈した一次抗体を室温にて 3 時間反応させ、その後 sABC 法 (LSAB2 kit, Dako, 京都) を用いてペルオキシダーゼを標識した。発色基質には 0.02% 過酸化水素水を含む 0.03% ジアミノベンチジン-PBS を用いて 3 分間発色させ、ヘマトキシリンで核対比染色を行った。

なお各反応の対照染色として、三法、すなわち 1 次抗体に代えて PBS を反応させる方法、1 次抗体の反応時間を 1 時間および 2 時間に設定する方法、1 次抗体の希釈を至適より倍数および三倍数にする方法を採用した。

表 1. 検索に用いた 1 次抗体の種類とタイプ

Category	Antibody to	Type
Homeotic gene products	Pax-9	goat polyclonal
	Hox-11	rabbit polyclonal
Cellular proliferation associated protein	proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	mouse monoclonal
Transforming growth factor superfamily	transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)	rabbit polyclonal
	transforming growth factor receptor- I (TGF- β R I)	rabbit polyclonal
	transforming growth factor receptor- II (TGF- β R II)	rabbit polyclonal
	bone morphogenetic protein -2/4 (BMP -2/4)	goat polyclonal
	bone morphogenetic protein -4 (BMP 4)	mouse monoclonal
	inhibin α	goat polyclonal
Nerve growth factor family	nerve growth factor (NGF)	rabbit polyclonal
	nerve growth factor receptor-1 (NGFR-1)	mouse monoclonal
	nerve growth factor receptor -5	rabbit polyclonal
	platelet derived growth factor-A (PDGF-A)	rabbit polyclonal
Epidermal growth factor family	transforming growth factor- α (TGF- α)	rabbit polyclonal
	heparin binding epidermal-like growth factor (HB-EGF)	goat polyclonal
	epidermal growth factor receptor (EGFR)	rabbit polyclonal
Fibroblast growth factor family	fibroblast growth factor-8 (FGF-8)	rabbit polyclonal
	fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1)	goat polyclonal
	fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR-2)	goat polyclonal

結 果

1. 光顕的観察結果

マウス口腔領域の発生は、オーバーラップする時期があったものの図 1 に示すように、原基発生期、成長期および臓器完成期 (完成期) の 3 期の過程に大別することができた。

その詳細は以下の如くであった。

- 1) 原基形成期
 - (1) 胎生 10 日

矢状断で胎児全周は、一層あるいは一部に二層の立方上皮に被蓋され、背側では頭方端から尾方端に走る神経管および体節、腹側では消化管および腹部頭方端の心臓隆起が主要な組織として認められた。そして全体が屈曲して頭方端と尾方端とが接近し、その結果として前頭部膨大部と腹側の心臓隆起との接点内側に、やはり単層の立方上皮で被蓋された原始口腔①が形成され、口咽頭窩部に上顎隆起②と下顎隆起③が認めら

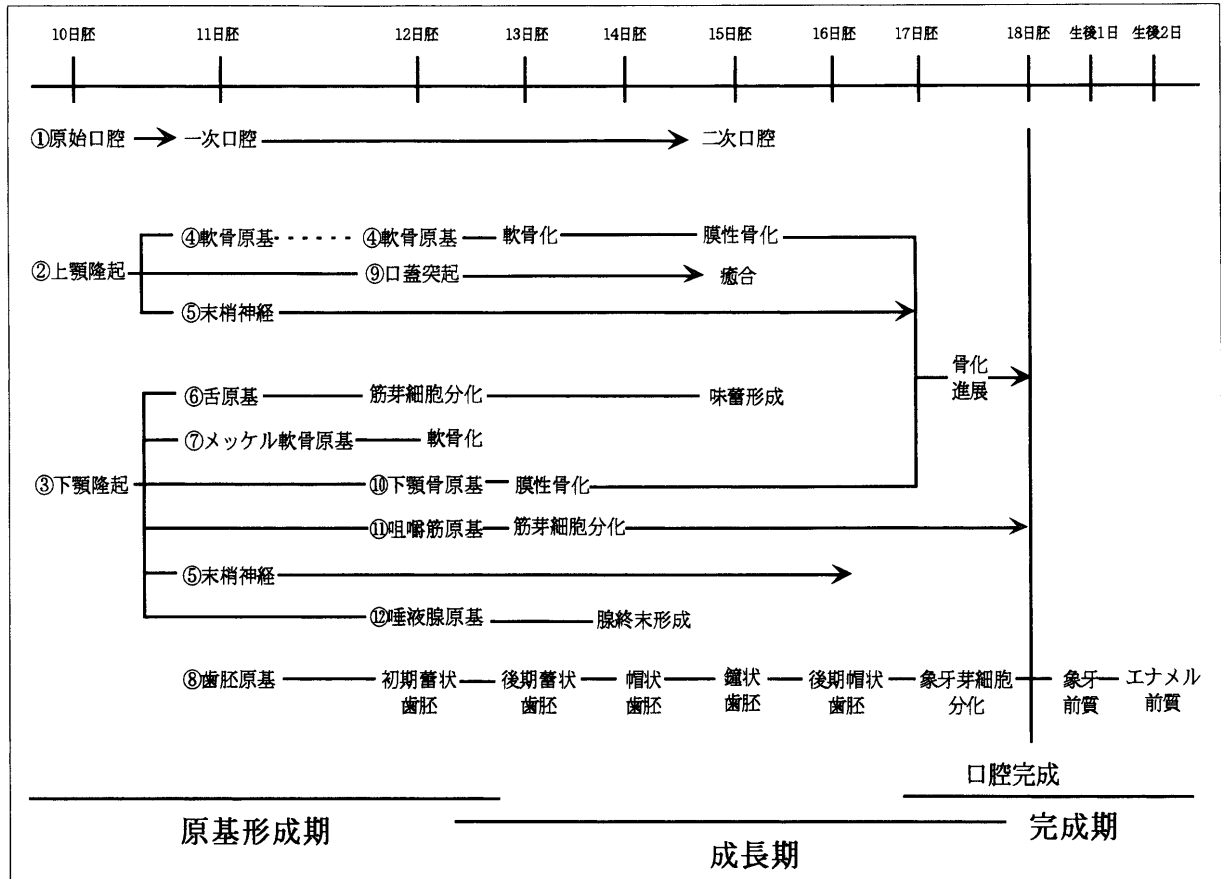


図1. マウス口腔発生の過程

れた。上顎隆起に相当する部位の間葉は疎らな星状細胞でのみ構成されていたのに対し，下顎隆起部の間葉は細胞密度が高く，紡錘形や立方形を中心に種々の形態を呈した(図2A)。

(2) 胎生11日

前頭断で脳と脊髄の分節化および体節の形成が認められ，口腔領域では，下顎隆起の急速な成長によって口腔は原始口窩から一次口腔に移行した。上顎隆起部では，正中部の間葉に細胞塊(軟骨原基)④が発生し，また眼胚とこの原基の間に細胞質の明るい細胞より成る空隙状の組織形成(末梢神経線維束)⑤が明確になった。下顎隆起部では中央部に舌原基⑥が，また，その両外側に外形が円形の細胞集塊(メッケル軟骨原基)⑦が形成された。さらに上下の口腔粘膜上皮部に左右二対の円柱状細胞(歯胚原基)⑧が生じた(図2B)。

(3) 胎生12日

口腔粘膜上皮はわずかに細胞層が増し，歯胚原基は上皮下に膨隆すると同時に，その周囲の間葉に立方形の細胞が分化し，初期歯胚(蕾状期歯胚)を形成した。これまで平坦であった上顎遠心1/3部付近で口窩方向への両側性の膨隆(口蓋突起)が生じ，その間葉細胞は立方細胞に分化した。上顎正中部の軟骨原基は，細胞密度がさらに高まるとともに細胞はやはり立方細胞に変化し，その周辺にも軟骨原基が新たに生じた。下顎部では，舌原基の中心部に紡錘形の細胞(筋芽細胞)

が分化した。メッケル軟骨原基は細胞密度が高まるとともに，軟骨の形状が明確になった。また，新たにこのメッケル軟骨底部から斜方に向かう細胞集塊(下顎骨原基)と，ここから頭方に走る立方状ないし短紡錘形の細胞集団(咀嚼筋原基)が生じた。また，舌原基下方に腺管(唾液腺原基)が発生した。

2) 成長期

(1) 胎生13日

前頭断で上顎部では，胎生12日に生じた正中部および鼻腔の両外側の細胞塊から軟骨が生じ，口蓋突起原基は突起の下顎方向への突出に伴って典型的な口蓋突起の形状を示すようになった。歯胚は円柱状細胞と内側の紡錘細胞の2層に分化するとともに，その周囲の間葉細胞の密度がさらに高まり，後期蕾状期歯胚に成長した。下顎部では，舌原基は筋層の走行から縦走，横走，輪走の3層が明確になった。この舌原基基部に両側性に生じた腺原基は，数層の細胞より成り，大きさを増した。メッケル軟骨は硝子軟骨の形状を呈するようになり，これをとりまく下顎骨原基は，下方から斜上方に向かって膜性骨化を開始した。さらに，その上方の咀嚼筋原基を構成する細胞も筋芽細胞に分化し始めた。

(2) 胎生14日

前頭断で口蓋突起は正中部をわずかに残して閉鎖し，二次口蓋形成直前の状態を示した。歯胚は，上顎部で

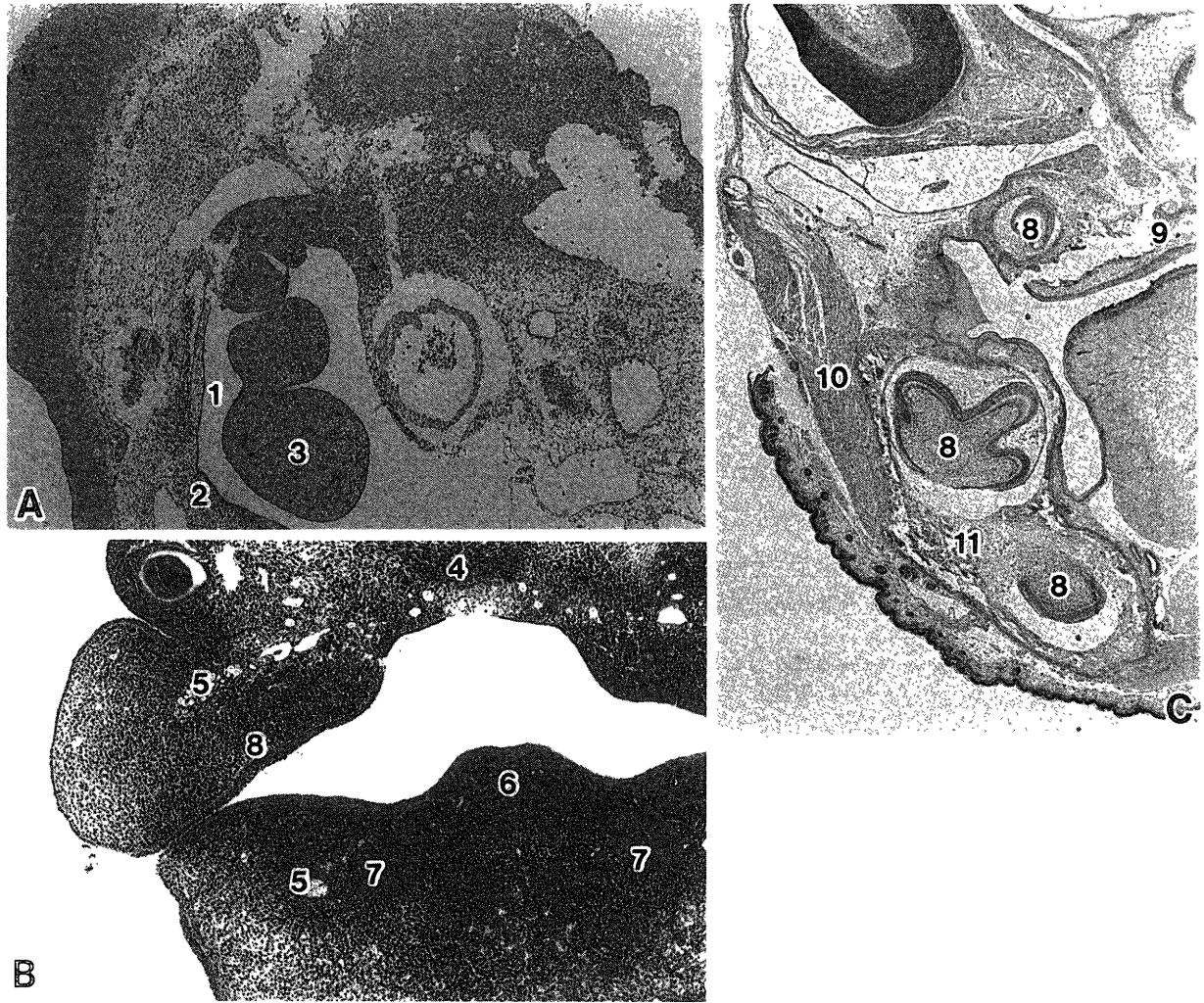


図2. 10日, 11日および18日胚 (HE染色)

A, 10日胚(矢状断), (original mag. $\times 10$); B, 11日胚(前頭断), (original mag. $\times 10$); C, 18日胚(前頭断), (original mag. $\times 5$), ①原始口腔, ②上顎隆起, ③下顎隆起, ④軟骨原基, ⑤末梢神経, ⑥舌原基, ⑦メッケル軟骨, ⑧歯胚原基, ⑨口蓋, ⑩咬筋, ⑪下顎骨

は帽状期歯胚の形状を, また下顎ではこれよりやや遅れて後期蕾状期の形状を呈した. 下顎骨の膜性骨化は, メッケル軟骨周囲でその底部から遠心外周をとりまくようにみられ, その底部と頭方部にさらに2つの筋原基の形成と筋芽細胞の分化が認められた. 舌では, 舌根部に新たに垂直方向に走る筋が縦隔を挟んで分化した. また, 舌下部の両側の腺原基では腺終末部の形成が明確になった.

(3) 胎生15日

前頭断で上顎部では口蓋突起は正中で完全に癒合し, 鼻腔は内腔が上皮で被蓋されるようになった. この鼻窩下方から上顎歯胚近心を囲むようにして, 胎生11日から13日の間に連続的に生じた軟骨から口蓋骨の膜性骨化が開始し, また, 上顎歯胚は鐘状期歯胚の形成を示した. 下顎でも下顎骨の形成は著しく進行し, 下顎歯胚は帽状期に移行した. また, 舌は前頭断で筋層を12層数え, 舌背部の上皮に味蕾の形成が開始された.

(4) 胎生16日

口腔全体の成長はわずかで, 胎生15日と比べて著しい変化はなかった. しかし, 下顎骨の骨化とその外周の筋の発育および歯胚の発育が進行した. 歯胚は鐘状期後期に入り, 歯乳頭の形成が明確になった. また, 下顎骨の正中側面の下顎大白歯歯胚下の末梢神経線維束(下歯槽神経)が明確になった.

(5) 胎生17日

前頭断で下顎骨は外形がほぼ整えられ, 下顎頭の形成も明確に認められるようになった. 上顎骨も次第に膜性骨化が進行したが, まだ非薄で全体が整っていない. また, 上顎部において鼻腔付近に五対の神経束が形成され, 口腔全体の末梢神経がほぼ完成された. 一方, 歯胚では象牙芽細胞への分化が開始した.

3) 完成期

(1) 胎生18日

口腔全体のほとんどの組織は⑨口蓋, ⑩咬筋ならびに⑪下顎骨のように完成された組織構造を示すようになった. しかし, 歯胚は前歯を含めて成長を続け, 象

牙芽細胞の細胞数が増加し、同時に歯乳頭に毛細血管の形成と血流を認めた(図2C)。

(2) 生後1日

上顎骨はすべてが連なって一塊となり、舌では口底に連なる縦走筋が著しく発達し、口腔全体の完成度が前日より進んだ。一方、歯胚は象牙芽細胞が円柱細胞に分化すると同時に、象牙前質の形成を開始した。

(3) 生後2日

歯胚は成長の途上にあり、エナメル前質の形成期の形状を示したが、その他の組織はさらに完成度を増した。

2. 免疫組織化学的検索結果

以上のマウス口腔領域の発生の過程を踏まえて、次に原基形成期(胎生10~12日)、成長期(胎生13~17日)および完成期(胎生18日~生後2日)の各時期における遺伝子産物の発現の様相を免疫組織化学的に検索した。なお、各一次抗体を用いた口腔領域の染色性は上皮組織(口腔粘膜上皮、歯胚上皮、腺上皮)、支持組織(間葉組織、歯胚間葉組織、軟骨組織、骨組織)、筋組織、神経組織の4つの組織に大別して観察した。

1) 各発現物質の免疫組織化学的所見

(1) ホメオティック遺伝子発現物質(Pax-9, Hox-11)

両発現物質の口腔領域における発現(陽性染色性)は図3Aに要約し得た。その検出所見を経時的にみると以下の如くであった。

a. 原基形成期

a) 胎生10日

Pax-9は全胎的に皮膚上皮とその上皮下間葉細胞に陽性を認めた。また、口腔領域でも粘膜上皮下および上顎部の間葉に多くの発現細胞を認めたが、下顎部では陰性であった。一方、Hox-11はPax-9と同様の細胞に加えて神経系の細胞にも陽性を示した(図3B, C)。

b) 胎生11日

Pax-9は口腔領域では陰性で、Hox-11は神経線維束のみに陽性を示した。

c) 胎生12日

全胎的には、Pax-9は胎生10, 11日で示したような間葉細胞の陽性が低下し、むしろ口腔領域に認めるようになり、口窩粘膜上皮部、歯胚上皮、メッケル軟骨原基、顎骨原基に明確な陽性を示した(図3D)。これに対してHox-11は口腔のほぼすべての細胞に強い陽性を示した。

b. 成長期

a) 胎生13日

両物質に対する染色性は著しく低下し、Pax-9は蕾状歯胚の中央部にのみ限局した陽性を示した。また、Hox-11も間葉細胞と神経線維束に陽性を認めたに停まった。

b) 胎生14日

Pax-9は口腔粘膜上皮と歯胚上皮に明確な陽性を示

した。これに対して、Hox-11は間葉細胞、軟骨組織部、骨組織部に陽性を示すようになった。

c) 胎生15日

Pax-9は口窩粘膜上皮と咬筋原基の筋芽細胞に陽性を示した(図3E)。一方Hox-11は神経線維束に最も強く陽性を示し、間葉細胞と咬筋などの筋芽細胞や骨芽細胞にも陽性を認めた。

d) 胎生16日

Pax-9は口窩粘膜上皮と歯胚に強い陽性を示し、Hox-11は胎生15日と同様の所見に加えて歯乳頭にも陽性を認めた。

e) 胎生17日

Pax-9は胎生16日と同様の所見を示し、とくに舌粘膜上皮の分化に伴ってこの部に強い陽性を認めた。一方、Hox-11は口腔全体に陽性を認め、口窩粘膜上皮や歯胚上皮にも陽性を認めるようになった。

C. 完成期

a) 胎生18日

両物質とも陽性を示す染色性が著しく低下した。

b) 生後1日

Pax-9は上皮成分のみに陽性を認めたが、歯胚上皮の染色性は消退し、またHox-11も上皮と神経線維束のみに陽性を示すに停まった。

c) 生後2日

Pax-9は口腔粘膜上皮のみに強い陽性を認めた。また、歯胚の内エナメル上皮細胞の基底側に再び明確な陽性を認めた。しかし、Hox-11は神経線維束のみに陽性を認めた。

(2) 成長因子の検出所見

a PCNA

10日胚から生後2日マウスにおけるPCNAの発現性は図4Aの如くの推移を示した。

a) 原基形成期

(a) 胎生10日および11日

PCNA陽性細胞は極めて少なく、口窩の被蓋上皮や上皮下の間葉の一部の細胞にのみに認められるにすぎなかった。

(b) 胎生12日

急速に陽性細胞が増え、被蓋上皮および上皮下間葉細胞のほぼすべてに陽性を示した(図4B)。

b) 成長期

(a) 胎生13日

胎生12日とは対称的にほとんどの陽性細胞が消退し、わずかにメッケル軟骨部とその周囲の下顎骨原基の骨芽細胞にのみ陽性を認めた。

(b) 胎生14日

胎生13日に比べてわずかに陽性細胞の増加を認めたが、それらは口腔粘膜上皮の一部、メッケル軟骨の軟骨細胞とその周囲の間葉細胞、上顎骨原基の軟骨細胞、上顎上皮下の間葉の一部にと限定的であった。

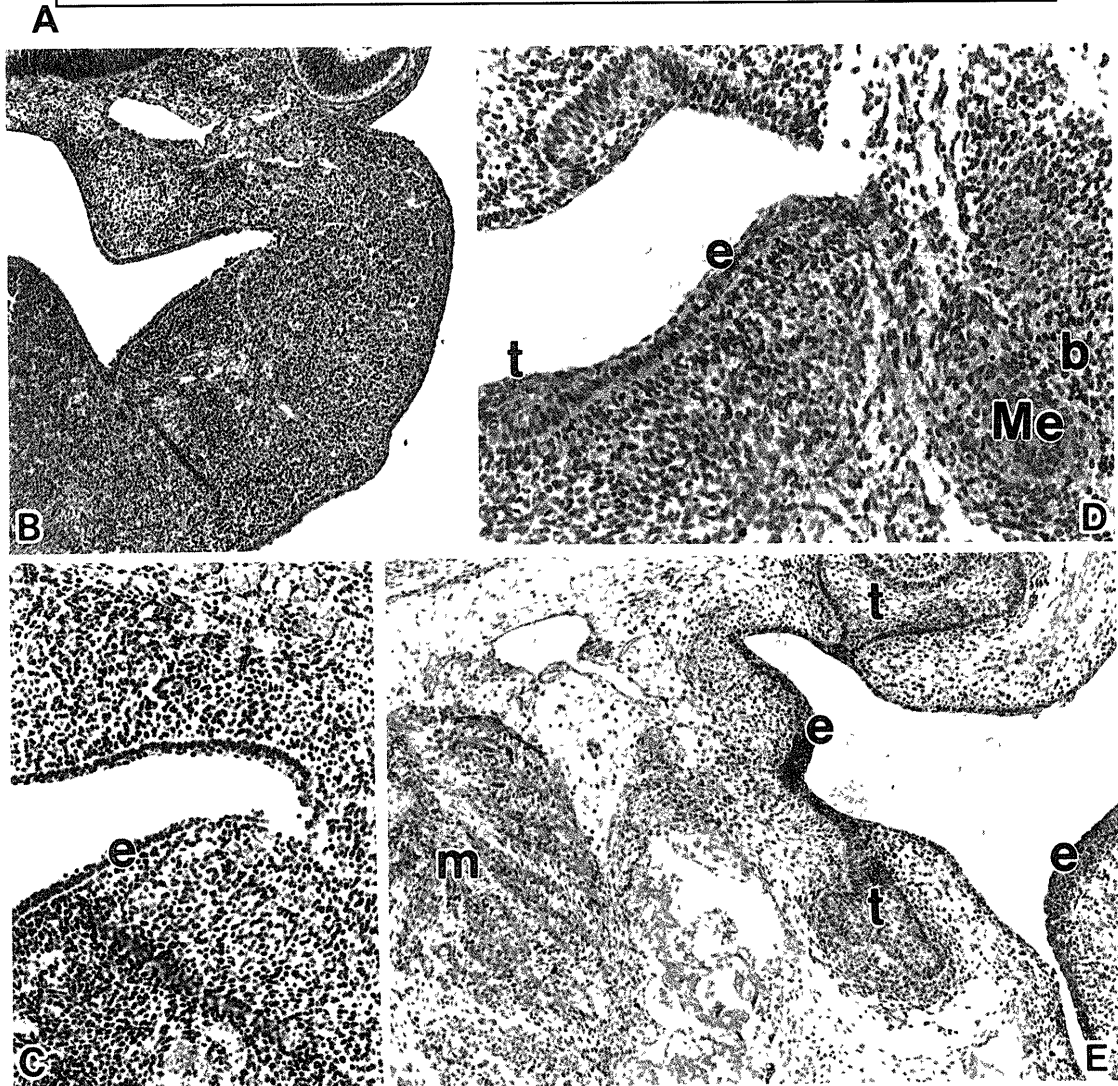
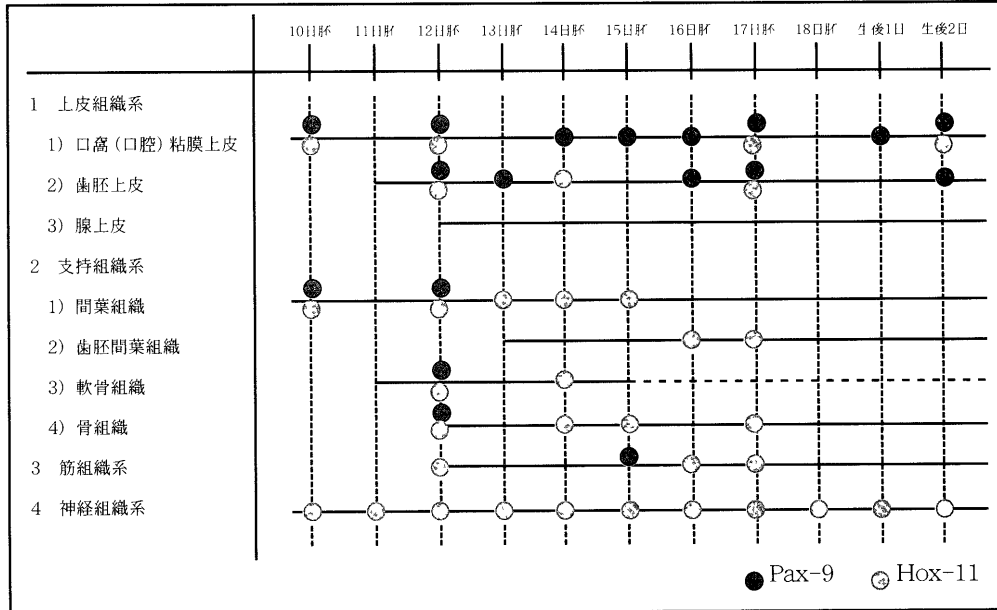
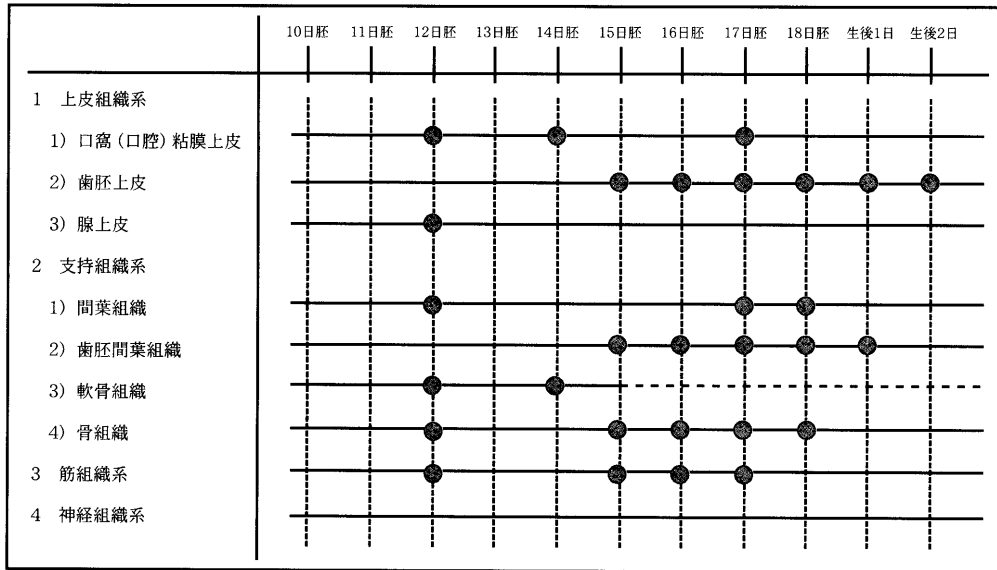


図3. ホメオティック遺伝子産物(Pax-9, Hox-11)の免疫染色
 A, 各発生器官における陽性発現の経時的变化; B, 10日胚(前頭断)の間葉におけるPax-9の発現(original mag $\times 10$); C, 10日胚(前頭断)の間葉におけるHox-11の発現(original mag $\times 25$); D, 12日胚(前頭断)におけるPax-9の発現(original mag $\times 25$); E, 15日胚(前頭断)におけるPax-9の発現(original mag $\times 25$); e, 口窩粘膜上皮; t, 歯胚; Me, メッケル軟骨; b, 下顎骨原基; m, 筋芽細胞



A

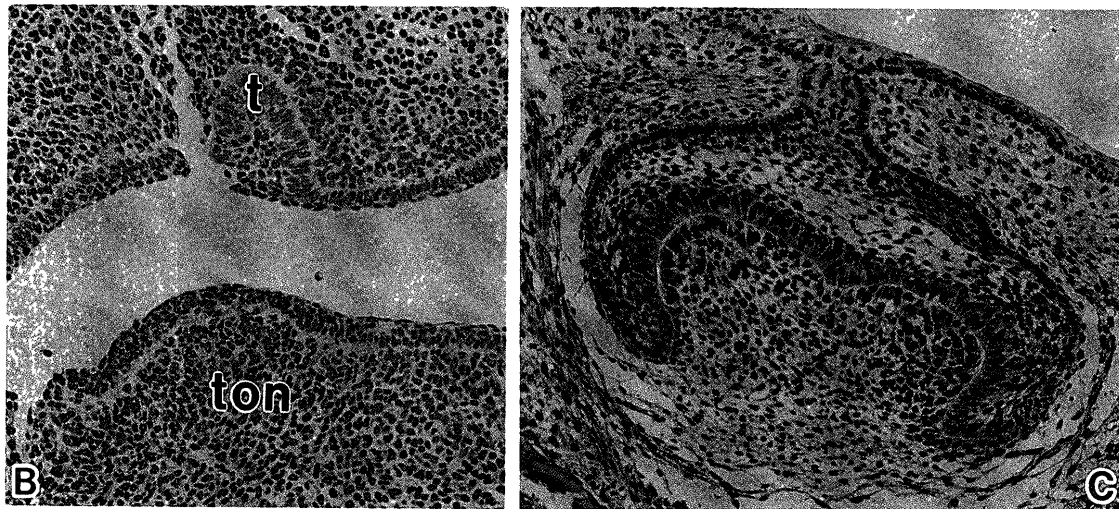


図4. PCNAの免疫染色

A, 各発生器官における陽性発現の経時的变化；B, 12日胚(前頭断)の歯胚(t)と舌原基(ton)におけるPCNAの発現(original mag ×25)；C, 17日胚(前頭断)の歯胚におけるPCNAの発現(original mag ×50)

(c) 胎生15日

陽性細胞がさらにわずかに増加する傾向を示した。

(d) 胎生16日

上下顎骨を形成しつつある骨芽細胞, 舌を含む全体の筋芽細胞, および歯胚のエナメル芽細胞, 歯乳頭細胞に陽性細胞が増加した。

(e) 胎生17日

陽性細胞数が飛躍的に増加し, とくに口腔粘膜上皮および歯胚の各陽性細胞の増加は顕著であった(図4 C)。

c) 完成期

(a) 胎生18日

骨を形成しつつある骨芽細胞, その周囲の間葉細胞および歯胚の間葉の多くに陽性を認めたのに対し, 他の口腔粘膜上皮とくに舌粘膜上皮, および舌を構成する筋(芽)細胞を含む各部の筋に染色性の低下を認めた。

(b) 生後1日および2日

生後1日では顎部全体の細胞にわたって陽性をほとんど認めなくなり, 生後2日になると, さらに陽性細胞数が減少し, わずかなエナメル芽細胞に陽性を認めるのみであった。

b. TGF-βスーパーファミリー(TGF-β1, TGF-βRI, TGF-βRII, BMP-2/4, BMP-4, Inhibin α,)

TGF-βスーパーファミリーの胎生10日胚から生後2日マウスの発現性あるいは染色性は図5 Aの如くに要約し得た。

a) 原基形成期

(a) 胎生10日

TGF-β1は全胎的には神経系細胞, 体節側板に認められ, 口腔領域では下顎の間葉細胞にのみ陽性細胞を認めた。TGF-βRIはこれとほとんど同様であったの

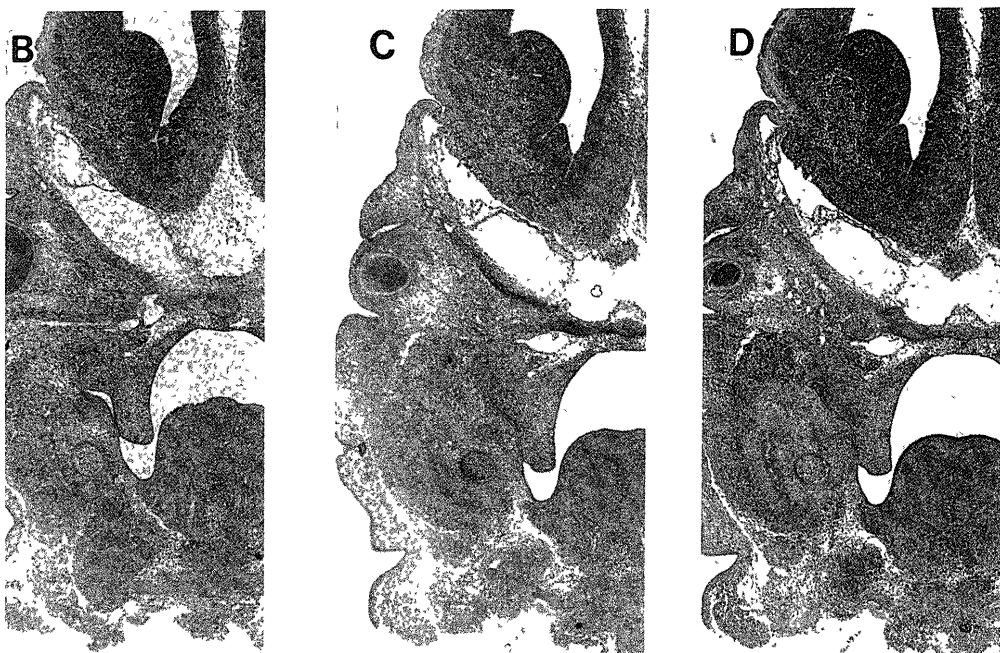
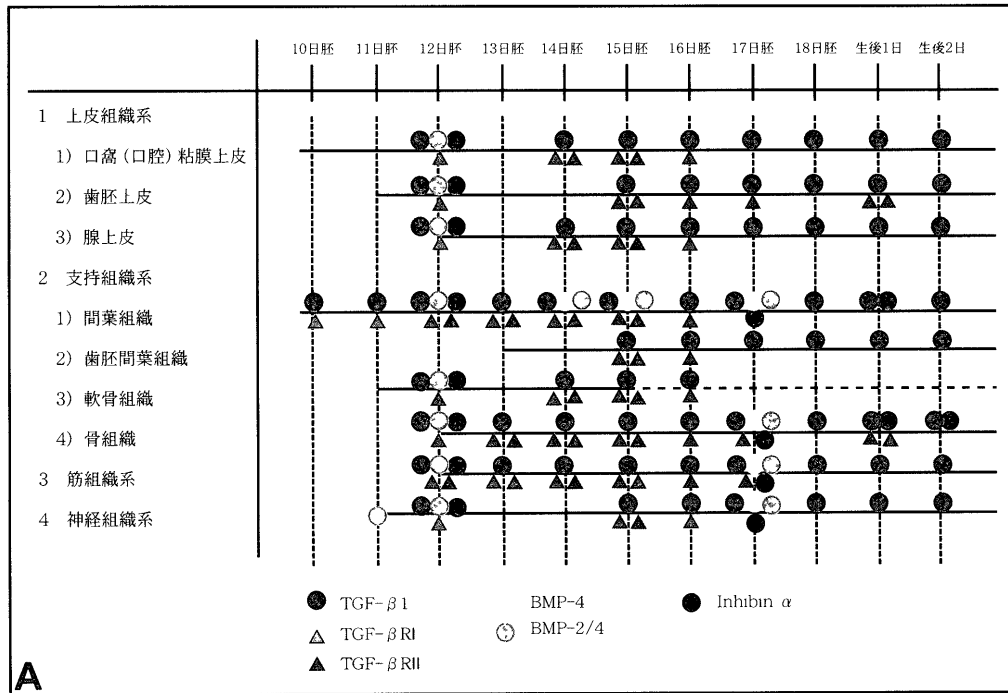


図5. TGF- β スーパーファミリーの免疫染色
 A, 各発生器官における陽性発現の経時的变化; B, CおよびD, 13日胚(前頭断)顔面におけるTGF- β 1, TGF- β RIおよびTGF- β RIIの各発現(original mag $\times 10$)

に対し, TGF- β RIIは陰性であった。一方, BMP-4, BMP-2/4は全胎的に広く陽性を認め, Inhibin α は背側の皮膚上皮に弱い染色性を認めたのみであったが, 口腔領域ではいずれに対しても陰性であった。

(b) 胎生11日

TGF- β 1とTGF- β RIは全胎的には内胚葉性細胞を除いてすべてに陽性を認めたのに対し, 口腔領域では上下顎の間葉細胞に陽性を認めた。なお, TGF- β RIIはいずれの細胞にも陰性であった。一方, BMP-4は陰性であるのに対し, BMP-2/4は皮膚上皮とその皮下の間葉細胞, 脳および脊髄神経の周縁, 末梢神経束

に陽性を認めた。しかし口腔領域では末梢神経のみに陽性であった。また, Inhibin α は全胎の皮膚上皮に弱い染色性を認めるのみであった。

(c) 胎生12日

TGF- β 1とTGF- β RIは口腔領域のすべての細胞で陽性を認め, また, TGF- β RIIも染色性は極めて低いものの, 間葉細胞と舌原基に陽性を認めた。BMP-2/4とInhibin α は全胎的に陽性を示すようになり, 頭頸部でもすべての細胞で陽性を認めた。また, BMP-4も口腔領域のほとんどすべての細胞に弱いながら染色性を示した。

b) 成長期

(a) 胎生13日

TGF- β 1, TGF- β RI およびTGF- β RIIは口腔全体の間葉細胞, 骨組織細胞, 筋芽細胞に強い陽性を認めたが, 上皮および軟骨組織細胞には極めて少なかった(図5B~D). 一方, BMP-2/4, BMP-4およびInhibin α はともに痕跡程度の陽性に变化した.

(b) 胎生14日

TGF- β 1, TGF- β RI およびTGF- β RIIは胎生13日と同様の所見に加えて, 上皮細胞, 軟骨細胞にも染色性が認められるようになった. 一方, BMP-2/4およびBMP-4は間葉細胞のみで発現を認め, Inhibin α には発現を認めなかった.

(c) 胎生15日

TGF- β 1, TGF- β RI およびTGF- β RIIは口腔すべての細胞が発現を示した. しかし, BMP-2/4, BMP-4およびInhibin α は間葉細胞に弱い染色性を示すのみであった.

(d) 胎生16日

TGF- β 1とTGF- β RIはほとんどすべての細胞に陽性を認めたが, TGF- β RIIの染色性は著しく低下した. また, BMP-2/4, BMP-4およびInhibin α の染色性は間葉細胞においても著しく低下した.

(e) 胎生17日

TGF- β 1はこれまでと同様に広く陽性を示したのに対し, TGF- β RIは舌の筋細胞, 歯胚のヘルトヴィッヒ上皮細胞, 骨芽細胞を除いて染色性が低下し, TGF- β RIIはほとんど消退した. 一方, BMP-2/4, BMP-4およびInhibin α は再び間葉全体と筋芽細胞, 神経束, 骨芽細胞に強い陽性を認めるようになった.

c) 完成期

(a) 胎生18日

TGF- β 1はすべての細胞に強い陽性を示したが, TGF- β RIとTGF- β RIIの染色性は痕跡程度であった. BMP-2/4, BMP-4およびInhibin α も胎生17日と同様の部位に弱い染色性を認めた.

(b) 生後1日

TGF- β 1の染色性は胎生18日と同様であり, TGF- β RIおよびTGF- β RIIは下顎骨の骨芽細胞と内エナメル上皮に再び陽性を認めた. 一方, BMP-2/4, BMP-4とも発現は痕跡程度であったが, Inhibin α は下顎骨の間葉, 骨芽細胞に陽性を示した.

(c) 生後2日

TGF- β 1の染色性は生後1日と同様であったのに対し, TGF- β RIとTGF- β RIIは陰性であった. また, BMP-2/4, BMP-4ともにさらに染色性が低下し, Inhibin α は骨芽細胞にのみ陽性を示した.

c. NGFファミリー (NGF, PDGF-A, NGFR-1, NGFR-5)

口腔発生の経過において, NGFファミリーは図6A

に示すような陽性あるいは染色性で推移した.

a) 原基形成期

(a) 胎生10日

NGFは口腔領域を含めてこの時期に現れたあらゆる細胞に陽性を示した(図6B). また, PDGF-Aは脊椎と前脳にのみ陽性を認め, 脳底と将来の口腔を形成する間葉との境界部の帯状に形成された網目状構造部にとくに強い陽性を示した. 一方, NGFR-1は仔胎全体を構成する細胞のほぼすべてに陽性を示し, 口腔領域でも口窩粘膜上皮とその上皮の間葉細胞に陽性を認め, NGFR-5はすべての細胞に陰性であった.

(b) 胎生11日

NGFは神経線維束, 口腔粘膜上皮および上皮間葉細胞のほぼすべてに陽性で, PDGF-Aは口腔領域では前脳と眼胚の間に分布する間葉, および口腔粘膜上皮の上顎と下顎の移行部直下の間葉のわずかな細胞に陽性を認めた. また, NGFR-1は口腔領域を含めて, 全胎的に胎生10日と同様にほぼすべての細胞に陽性で, 口腔ではとくに眼胚下方の末梢神経に強い陽性を示した. これに対してNGFR-5は陰性であった.

(c) 胎生12日

NGFはこの時点で生じた口腔の各原基のすべての細胞に陽性であった. さらに, PDGF-Aは下顎骨の間葉細胞にのみ陽性を示し, NGFR-1はすべての細胞に陽性を示し, とくに口窩粘膜上皮, 舌, メッケル軟骨, その周囲の骨芽細胞と筋芽細胞に強い陽性を示した. また, NGFR-5もこれら細胞群を中心に陽性を認めるようになったが, その染色性はNGFR-1と比べると弱かった.

b) 成長期

(a) 胎生13日

NGFはすべての細胞に陽性を示したのに対し, PDGF-Aは陰性であった. また, NGFR-1, NGFR-5ともに著しい染色性低下を示した.

(b) 胎生14日

NGFの陽性細胞は数多くなり, とくに歯胚のエナメル上皮と歯乳頭, 腺上皮, 各筋芽細胞, 骨芽細胞に強い陽性を示した. また, PDGF-Aは顎骨形成部の間葉細胞の少数に陽性を認め, NGFR-1およびNGFR-5の染色性はともに弱かった. しかしその中で, NGFR-1は下顎骨の骨芽細胞と咬筋の筋芽細胞に, またNGFR-5は口蓋突起の間葉にそれぞれ陽性を示した.

(c) 胎生15日

NGFはすべての細胞に強い陽性を示した. 一方, PDGF-Aは舌筋と咬筋の筋芽細胞に陽性を認め, NGFR-1およびNGFR-5はともに胎生14日と同様の染色性を示した.

(d) 胎生16日

NGFはすべての細胞に強い陽性を示した. 一方, PDGF-A, NGFR-1およびNGFR-5は胎生15日と同様

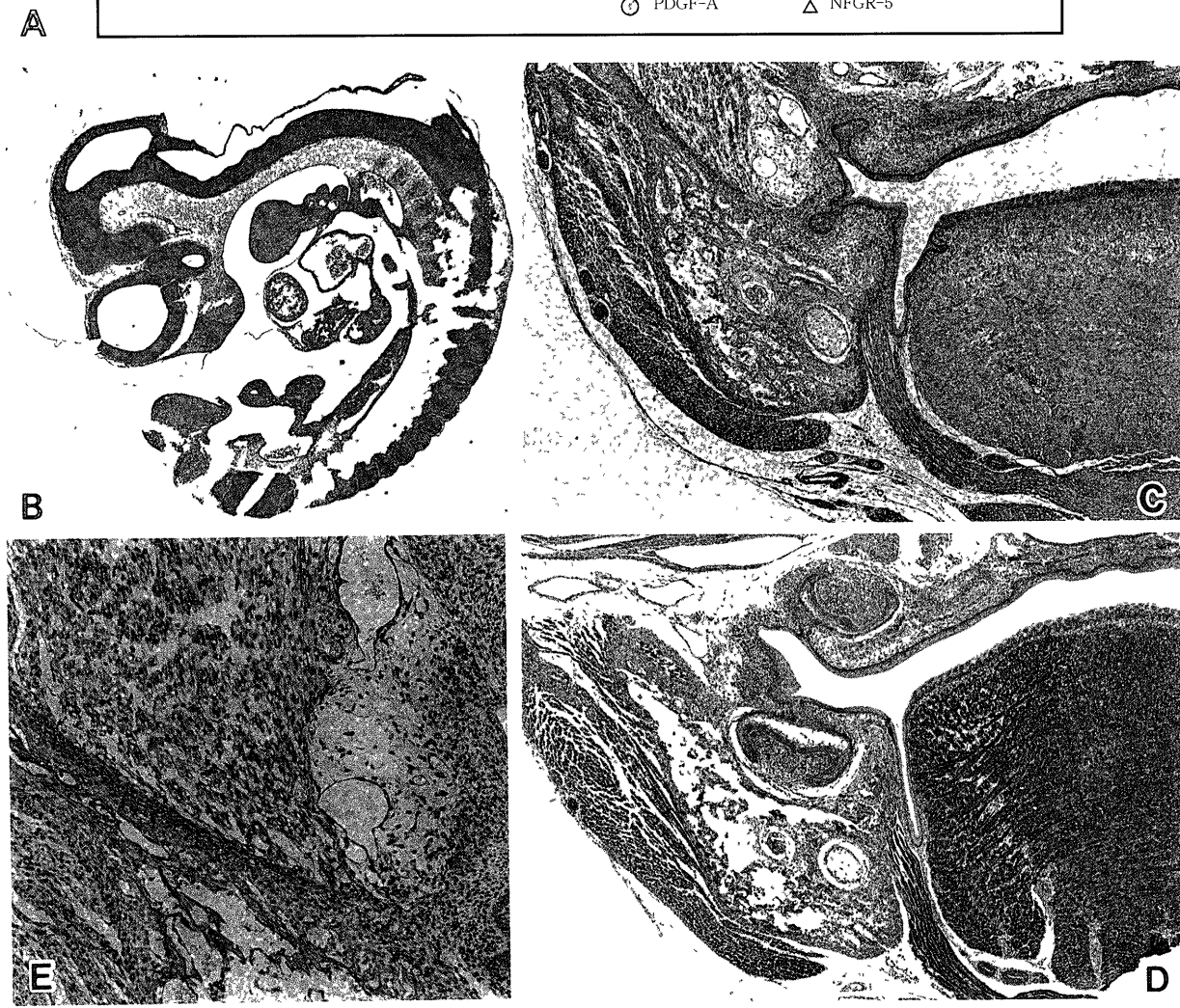
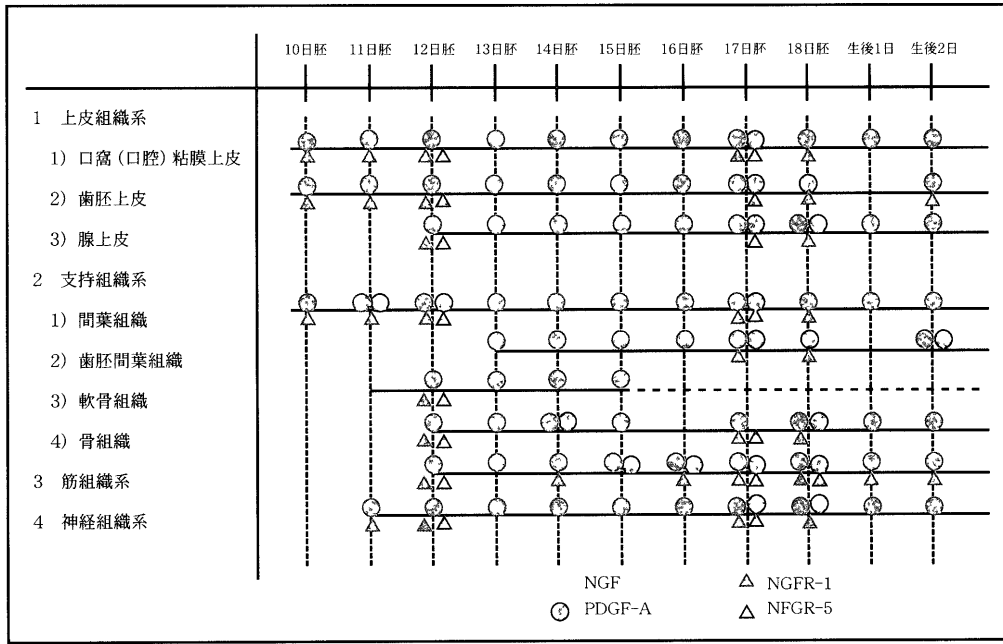


図6. NGFファミリーの免疫染色
 A. 各発生器官における陽性発現の経時的变化；B, 10日胚(矢状断)におけるNGFの発現；C, DおよびE, 17日胚(前頭断)におけるNGF, NGFR-1およびPDGF-Aの発現(B, original mag × 5；C and D, original mag × 10；E, original mag × 25)

の染色性を示し、とりわけNGFR-1は舌筋群に強い陽性を示した。

(e) 胎生17日

NGFはすべての細胞に陽性を示し、NGFR-1およびNGFR-5も同様の染色性を示し、とくに筋(芽)細胞に強い陽性を認めた(図6 C, D)。また、PDGF-Aも筋芽

細胞や骨芽細胞を中心に陽性を認めた(図6E).

c) 完成期

(a) 胎生18日

NGFは口腔全域の細胞に陽性を認めたが、歯胚上皮および同間葉の染色性は消失した。一方、PDGF-Aは胎生17日と同様の染色性を示し、NGFR-1は筋群にとくに強い陽性を示し、歯胚でも上皮、歯乳頭のほぼすべての細胞に陽性であった。これに対してNGFR-5は筋群と顎骨骨膜細胞に明確な陽性を示したのみであった。

(b) 生後1日

NGFの染色性はやや低下したが、上皮と筋における染色性は強かった。一方、PDGF-Aは陰性であった。NGFR-1は筋群とくに舌筋群に強い陽性を示したが、他では染色性が著しく低下し、NGFR-5は痕跡程度の染色性であった。

(c) 生後2日

NGFは生後1日と同様であったが、新たに内エナメル上皮と象牙芽細胞に陽性を認めた。PDGF-Aは象牙前質に限局性の陽性を示し、NGFR-1は筋群と歯胚の内エナメル上皮に陽性を示したが、NGFR-5は痕跡程度の染色性であった。

d. EGFファミリー(TGF- α , HB-EGF, EGFR)

EGFファミリーは図7Aのような発現性あるいは染色性の推移を示した。

a) 原基形成期

(a) 胎生10日

TGF- α は胎児背側の皮膚上皮細胞の少数に陽性を認め、またEGFRは全胎的に陽性あるいは染色性を示した。これに対してHB-EGF陽性細胞は全く認めなかった。口腔領域ではEGFRのみ上皮および上顎部の間葉に明確な陽性を示した。

(b) 胎生11日

TGF- α は、全胎的には尾方の間葉を中心に陽性細胞を数多く認め、口腔領域では口窩上皮、上皮下間葉と舌原基の細胞に陽性を示した。しかし、HB-EGFは染色性を示さなかった。一方、EGFRは胎生10日と同様に陽性細胞は全胎にわたり、口腔では筋組織以外のすべての細胞に陽性を示した。

(c) 胎生12日

すべてのファミリーは口窩粘膜上皮、メッケル軟骨原基を始めとする各軟骨原基、およびその周辺の骨芽細胞原基に陽性を示した(図7B,C)。

b) 成長期

(a) 胎生13日

TGF- α は、口蓋突起部の間葉細胞に陽性を示したほかは染色性が著しく低下した。また、HB-EGFは上顎部の間葉細胞と舌の筋芽細胞の一部にのみ陽性を認めた。一方、EGFRはTGF- α よりも広範に陽性を示したが、その染色性は低下した。

(b) 胎生14日

TGF- α は痕跡程度の染色性を、HB-EGFは口蓋突起部の間葉のみに弱い染色性を示した。EGFRも染色性の低下を示したが、咬筋の原基細胞(筋芽細胞)にのみ陽性であった。

(c) 胎生15日

TGF- α は咬筋の筋芽細胞にのみ明確な陽性を示し、HB-EGFは上顎口腔粘膜上皮下間葉、メッケル軟骨周囲の間葉、上下歯胚周囲の間葉および咀嚼筋群の筋芽細胞の一部に陽性を認めた。また、EGFRは胎生14日と同様に筋芽細胞に陽性で、染色性はかなり高まった。

(d) 胎生16日

TGF- α とEGFRは再び口腔全体にそれらの染色性が高まり、とくに顎骨部の骨芽細胞、筋群の筋芽細胞、歯胚の内エナメル上皮と歯乳頭細胞に明確であった。一方、HB-EGFは口腔全体の間葉細胞、骨組織細胞、咀嚼筋の筋芽細胞の一部に弱い染色性を認めるのみであった。

(e) 胎生17日

いずれのファミリーも胎生16日と同様の部位に認め、その染色性は高くなった。また、歯胚において歯胚上皮基底膜と歯乳頭細胞に陽性を示した。

c) 完成期

(a) 胎生18日

TGF- α の染色性は胎生17日と同じであったがその発現性は低下した。しかし歯胚と顎骨骨膜および骨芽細胞に明確な陽性を示した。HB-EGFは胎生17日とほぼ同様であったが染色性は低下した。一方、EGFRは筋群と歯胚上皮に強い陽性を示した。

(b) 生後1日および2日

いずれも痕跡程度の弱い染色性を示した。

e. FGFファミリー(FGF-8, FGFR-1, FGFR-2)

FGFファミリー全体の発現性あるいは染色性の推移は図8Aの如くであった。

a) 原基形成期

(a) 胎生10日

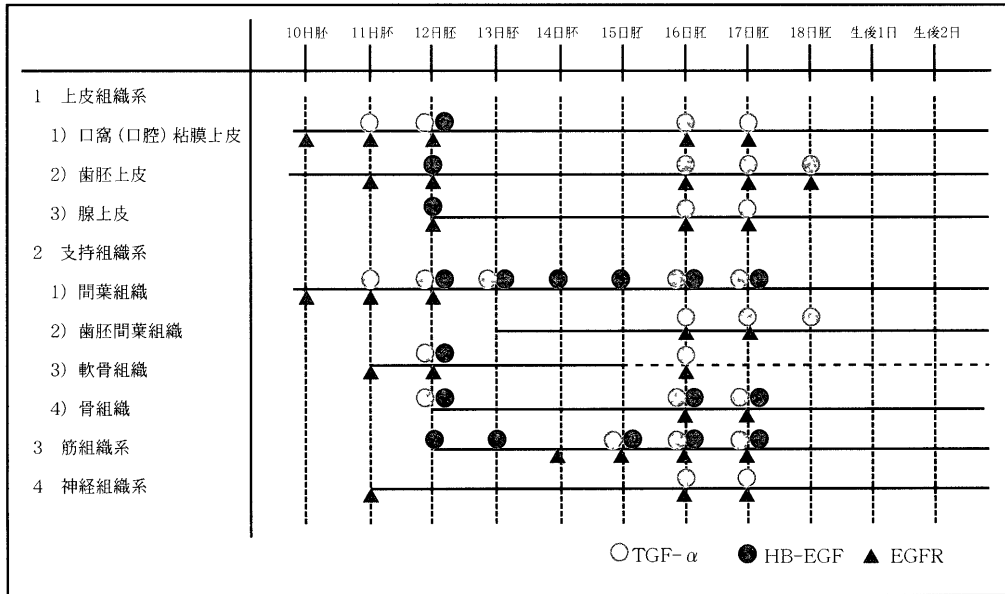
FGF-8とFGFR-2は全胎的に陰性で、FGFR-1は脊側皮膚上皮の極一部の細胞にのみ弱い染色性を示した。

(b) 胎生11日

FGF-8は全胎の皮膚上皮が痕跡的な染色性を示し、FGFR-2は陰性であった。一方、FGFR-1は皮膚上皮の大部分の細胞と上皮下間葉細胞に明確な染色性を示した。また、口腔領域でも眼胚より下方の皮膚上皮と同上皮下間葉に陽性を示した。

(c) 胎生12日

FGF-8は口腔領域の間葉細胞のほぼ全体に陽性を示すようになったが、染色程度はやや低く、メッケル軟骨部を始めとする軟骨部の細胞は陰性であった。また、FGFR-1とFGFR-2はともに陰性であった。



A

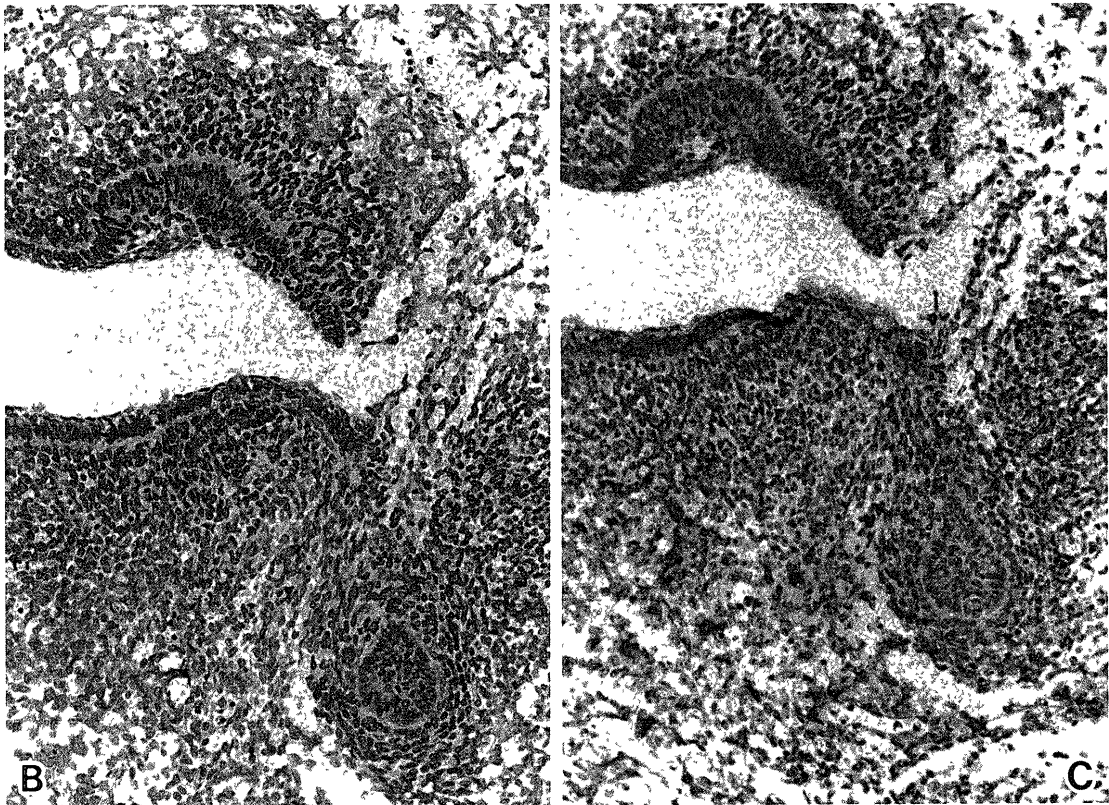


図7. EGFファミリーの免疫染色

A. 各発生器官における陽性発現の経時的変化；BおよびC, 12日胚の前頭断におけるTGF- α ならびにEGFRの発現(original mag $\times 25$)

b) 成長期

(a) 胎生13日

FGF-8は上顎部の間葉細胞, とくに口蓋突起の細胞に明確な陽性を示したほかはほとんど陰性であった。また, FGFR-1とFGFR-2はともに陰性であった。

(b) 胎生14日

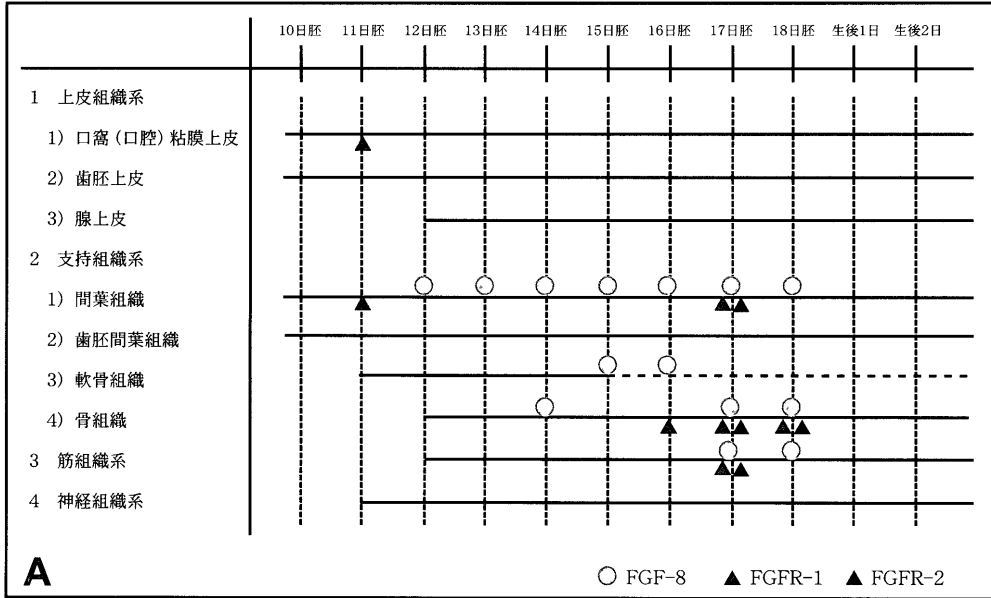
FGF-8は, 口蓋突起部および下顎部の間葉細胞に陽性を示したが, FGFR-1およびFGFR-2はすべての細胞に陰性であった。

(c) 胎生15日

FGF-8は上顎部の間葉と下顎部のメッケル軟骨と下顎歯胚周囲の間葉に陽性であった。なお, 歯胚全体, 軟骨部, 舌はすべて陰性であった。一方, FGFR-1およびFGFR-2はすべての細胞に陰性であった。

(d) 胎生16日

FGF-8は胎生15日とほぼ同様に, FGFR-1は下顎骨周囲の骨芽細胞にのみ陽性を示し, FGFR-2はすべての細胞に陰性であった。



A

○ FGF-8 ▲ FGFR-1 ▲ FGFR-2



B

図8. FGFファミリーの免疫染色

A. 各発生器官における陽性発現の経時的変化; B. 17日胚の前頭断におけるFGF-8の発現(original mag ×10)

(e) 胎生17日

FGF-8は全体的に染色性が強まり、とくに上顎部の間葉、下顎部の下顎骨周囲の骨膜組織、咬筋の筋芽細胞に強く、同時に歯乳頭細胞にも陽性を示した(図8B)。一方、FGFR-1およびFGFR-2はFGF-8の発現部にほぼ一致した細胞に弱い染色性を示した。

c) 完成期

(a) 胎生18日

FGF-8は胎生17日とほぼ同様であったが、その染色性は低下した。一方、FGFR-1およびFGFR-2はともに下顎骨部、とくに下顎頭付近の骨芽細胞にのみ陽性を示したほかは陰性であった。

(b) 生後1日および2日

FGF-8は顎骨の骨芽細胞を除いて口腔全体で痕跡程度の染色性を示すのみに変化し、FGFR-1およびFGFR-2はすべての細胞に陰性であった。

2) 各遺伝子産物の発現性(染色性)の傾向

以上のように、各遺伝子産物は口腔を形成しつつある組織細胞に対して、また経時的にみて極めて多様な発現性あるいは染色性を示した。この点を個々に取りあげて検討すると以下の如くであった。

(1) 組織細胞別にみた各遺伝子産物の発現性(染色性)

各原基を含めて、口腔発生に現れたすべての組織細胞を上皮、支持、筋および神経組織の4種に分け、これら組織細胞に発現、あるいは検出された各遺伝子産物を要約すると表2の如くになった。この表から各遺伝子産物の組織細胞別の発現性あるいは染色性は、①ほとんどすべての組織に認められるもの、②いずれかに限定的に検出されるものに区別された。

今回の遺伝子産物の多くは①の傾向を示したのに対し、ホメオティック遺伝子産物のPax-9とHox-11は発

表2. 組織別にみた各遺伝子産物の陽性発現

	epithelial tissue	connective tissue	muscular tissue	nervous tissue
Pax-9	+	+	+	+
Hox-11	+	+	+	+
PCNA	+	+	+	-
TGF- β 1	+	+	+	+
TGF- β R I	+	+	+	+
TGF- β R II	+	+	+	+
BMP-2/4	+	+	+	+
BMP4	-	+	+	+
Inhibin- α	+	+	+	+
NGF	+	+	+	+
NGFR-1	+	+	+	+
NGFR-5	+	+	+	+
PDGF-A	+	+	+	+
TGF- α	+	+	+	+
HB-EGF	+	+	+	+
EGFR	+	+	+	+
FGF-8	-	+	+	-
FGFR-1	+	+	+	-
FGFR-2	-	+	+	-

生初期には多くの組織細胞に発現されたが、次第に②の傾向に変化し、さらにFGFファミリーは全過程において②の傾向を示すことが明らかになった。

なお、Pax-9は経過とともに上皮性細胞に、Hox-11は非上皮性細胞に発現を認め、FGFファミリーはさらに特異性が強く、支持組織細胞にのみ発現を認めた。

(2) 各遺伝子産物の経時的推移

次にこれら遺伝子産物が明確な染色性を示して検出された時期に焦点を当てると次のような傾向が認められた。すなわち③口腔発生の全期間を通じて連続性に認められたもの、④不連続性に認められたもの、および⑤特定の時期にのみ認められたものの3型があった。

この中で③の傾向を示したのは、ホメオティック遺伝子産物(Pax-9およびHox-11)、PCNA、TGF- β スーパーファミリーのTGF- β 1、NGFファミリーのNGFであり、④のそれはTGF- β スーパーファミリー

のBMP-4、BMP2/4およびInhibin α 、NGFファミリーのPDGF-A、EGFファミリーのTGF- α 、HB-EGF、FGFファミリーのFGF-8で、⑤のそれはこれら成長因子のレセプター群であった。

(3) 成長因子とそのレセプターの発現性(染色性)の関係

さらに、各ファミリーのリガンドとレセプターの関係について検討してみると、両者が必ずしも⑥同一時期に同一組織細胞に発現されない時期と、⑦合致する時期とに分かれる傾向を示した。

この傾向のうち⑦について各遺伝子発現物質別にみると、図9のようにTGF- β スーパーファミリーでは胎生13~15日胚および生後1日マウスに、NGFファミリーでは胎生11~12日胚および胎生17~18日胚に、EGFファミリーでは胎生11~12日胚および胎生16~18日胚に、FGFファミリーでは胎生17~18日胚におい

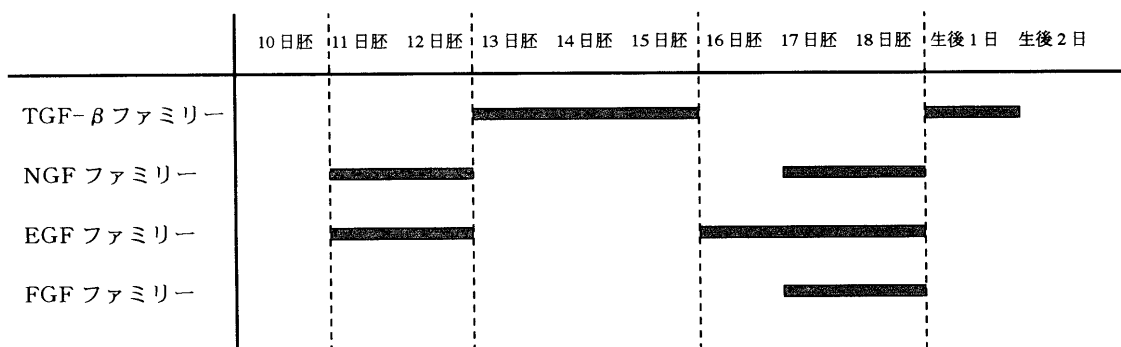


図9. 各遺伝子発現物質とレセプターの同時発現期間

て発現を窺うことができた。

これらの所見から、FGFファミリーが成長期後半のみに同時発現するのに対し、他のTGF- β スーパーファミリーとNGFファミリーおよびEGFファミリーの3種のファミリーは胎生11~12日胚および胎生16~18日胚の二つの時期にピークを示す、いわゆる二相性の

考 察

受精・分割から始まり、各種の原基が形成される間において、個体発生に關与する遺伝子群が秩序正しく活性化され、発生の初期段階において最も重要な前後軸形成、背腹軸形成、左右軸形成の体軸形成とそれぞれの軸に沿ったパターン形成が生じる。このような体軸形成とパターン形成に關与する体軸遺伝子群は、母性効果遺伝子群と分節遺伝子群に大別され、分節遺伝子群にはさらにギャップ遺伝子群、ベア・ルール遺伝子群、セグメント・ポラリティー遺伝子群がある¹⁾。

これら遺伝子の中で、最初に発現するのは母性効果遺伝子群で、一般にオーガナイザーと呼ばれる部域で発現される。マウスのオーガナイザーは頭部オーガナイザーおよび体幹オーガナイザーで、頭部オーガナイザーはノード(ヘンゼン結節)と原条であり、体幹オーガナイザーは前方臓側内胚葉である³⁻⁶⁾。すなわち胎生4.5日で着床したマウス胚は、5.5日胚で臓側内胚葉(AVE)と卵円筒(胚性外胚葉)の二層を形成し、6.5日胚で三層目の原条(中胚葉)を生じ、ノードでは*T. Cripto*などの遺伝子が、またAVEでは*Otx 2*や*Lim 1*などの遺伝子がそれぞれ発現する⁷⁾。そして体軸近位の胚性外胚葉における*T. Cripto*遺伝子の発現、および遠位臓側内胚葉におけるHex遺伝子の発現が前方臓側内胚葉へ移動する結果として、近位-遠位軸から上位-下位軸への回転が生じる。

背腹軸形成はショウジョウバエや両生類でよく検討されている。ショウジョウバエでは、背腹軸は母性遺伝子カスケード機構とこれに引き続いて生じるザイゴティック遺伝子の作用で確立される。ザイゴティック遺伝子は背側部位決定に關与し、それには*dpp*、*tld*、*zen*、*sew*、*seg*、*tsg*、*shren*の7種の発現が必要であり、この中でTGF- β スーパーファミリーのBMPタイプのリガンド*dpp*が最も重要である⁸⁻¹⁰⁾。*dpp*は胚の背側で均一に発現し、活性の勾配を形成する必要がある^{11,12)}。この際に、母性遺伝子産物のカスケード機構が受精後の何回かの核分裂の後に、細胞膜上に均等に分布するTollタンパクを腹側のみで活性化し、これによって下流のDorsalタンパクがリン酸化され、Dorsalは核内に入り、下流のザイゴティック遺伝子の発現調節を行う⁸⁾。そして、Dorsalの濃度が最も高い最腹側で*twist*、*snail*が活性化されて中胚葉を分化させ、腹側外胚葉で*sog*、*rho*が活性化されて神経外胚葉に分化して行くことになる。因みに、*tld*は*dpp*の上流に位置

発現傾向があることが明らかであった。そしてさらにTGF- β スーパーファミリーのみが成長期前半と完成期にNGFファミリーとEGFファミリーが原基形成期と完成期前後に、そしてFGFファミリーは完成期前後のみに同時発現することが判明した。

し、*dpp*の活性を増強するが、その遺伝子産物のアミノ酸配列はBMP-1と高い相同性を示す¹³⁾。さらに*sog*は*dpp*活性を抑制する^{14,15)}が、その遺伝子産物はアミノ酸1,038残基から成る分泌性タンパクで¹⁶⁾、BMP-4の腹側化作用を阻害するChordinと類似し¹⁷⁾、両者が機能的に相関性を示すことも明らかにされている^{14,18)}。また両生類の背側軸形成のオーガナイザーの原口上唇部は、これ自体が脊索前板、脊索、体節の一部に分化するだけでなく、囊胚期には背側外胚葉に神経組織を誘導すると同時に、側方の中胚葉を背側化し、体節の一部になる。誘導された神経組織は、前脳、中脳、後脳、脊髄へ部域化することから、オーガナイザーは前後軸の形成をも支配することが明らかである。そしてこのオーガナイザーの位置の決定には、背側化活性を有するWntシグナルと、中胚葉誘導活性を有するTGF- β スーパーファミリーのシグナルとが協同して行われることも明らかにされている¹⁹⁾。このようなWntシグナル伝達は β -cateninの分解を阻止し、これによって β -cateninは細胞質に貯留した後、核内に移動して転写因子(T-cell factor)と結合し、ホメオドメインを有する転写因子の*siamois/twin*やTGF- β スーパーファミリーの*Xnr 3*遺伝子の転写を活性化する²⁰⁾。

左右軸については、ニワトリの初期胚のヘンゼン結節の左側で発現されるソニックヘッジホッグ(*shh*)の発現が左右非対称性を決定すること²¹⁻²⁴⁾が明らかにされて以来、急速に解明が進み、マウスにおいて*lefty*²⁵⁻²⁷⁾や*Pitx 2*^{28,29)}の存在が発見されるに至った。*Pitx 2*はドコイド型ホメオボックス遺伝子であり、*nodal*に誘導されて内蔵の中胚葉の左側に発現し、左右軸非対称性の決定に重要であること、さらに*Pitx 2*は脳下垂体や筋肉および歯の形成にも関係していることが明らかにされた³⁰⁻³²⁾。

以上のような体軸決定遺伝子群が発現する間に、これに属する遺伝子や、次に活性化される遺伝子群であるギャップ、ベアルール、セグメント・ポラリティーが体節の形成にあずかる。すなわち、ベアルール遺伝子群は体節形成初期に発現し、続いてセグメント・ポラリティー遺伝子群は体節の境界を確立すると同時に体節の型形成に關与する。一方、ギャップ遺伝子群はこれら遺伝子群の転写調節因子として機能する。そしてこのようにして形成された体節の各部に特徴付け(同部の組織発生と原基形成)が生じるが、これにはホ

メオティック遺伝子群が関係する³³⁻⁴³⁾。

これに対して、口腔領域の発生は体節ではなく顔面隆起に由来する。顔面隆起は各1対ずつの内・外側鼻突起、上顎突起、下顎突起より成り、これらは中胚葉性間葉細胞と神経堤由来の外胚葉性間葉を混じた四胚葉性組織で、口窩はその内部の消化管前方の咽頭部分における左右一対の弓状構造物、すなわち咽頭弓に囲まれ、口腔諸組織はこの咽頭弓から発生する^{44,45)}。

このように、口腔領域の発生は神経系発生と密接に関係している。その神経系の発生については、形態的にはよく知られているが分子生物学的機構については現在もなお不明の部分が多い。In vitroでは、ChordinやNogginが神経分化を負に制御するBMP-4を不活性化することによって、未分化外胚葉性間葉を中枢神経系細胞に分化・誘導することがすでに知られている^{46,47)}。さらにChordin下流のディファレンシャル・スクリーニングによって存在が明らかにされた*Zie-1*, *Sox 2*, *Sox D*に対するmRNAの微量注入法によって、これら遺伝子群は神経誘導の下流因子であることも次第に分かってきた^{48,49)}。そして、このように神経細胞へと分化する前駆細胞の神経幹細胞または神経前駆細胞は、神経管に存在する分裂細胞とみなされるようになった^{50,51)}。この幹細胞には神経堤幹細胞と中枢神経系幹細胞があり、前者はニューロンやグリアを作ること^{52,53)}、これにはFGF-2やEGFなどのmitogenを必要とする^{50,51)}ことがin vitroで明らかにされた。

一方、神経堤細胞は神経板と表皮外胚葉の間に形成され、脱上皮化の後に線維芽細胞の細胞形態を示し、胚体内を広く移動して種々の組織を形成する。この中で、末梢神経節の形成時には、Notchとそのリガンドを発現することが知られている^{54,55)}。Notchは膜タンパク⁵⁶⁾であり、大分子量の一回膜貫通型タンパクのレセプターと結合することによって側方抑制を行う⁵⁷⁾。しかし、これ以外の神経堤由来の間葉細胞の分子生物学的知見は予想外に少ない。その中でもMatsuoら⁵⁸⁾およびOsumi-Yamashitaら⁵⁹⁾は、Pax-6欠失ラットでは眼と鼻の形成不全(鼻裂を作る骨格の欠如)を起こすことから、Paxは顔面隆起や咽頭弓に頭部神経堤細胞の分化に関連していることを明らかにしている。また、このような頭部神経堤細胞の移動と分化は、頭部神経原基の分節、すなわち前脳、中脳、後脳および後脳の分節のロンボメア(前方よりプロロンボメアA, B, C, D)に密接に関係していることも明らかにされた⁶⁰⁾。すなわち、中脳とプロロンボメアAからの神経堤細胞は第一咽頭弓(顎骨弓)に、同B, C, Dからの神経堤細胞は第二(舌骨弓)、第三、第四咽頭弓の間葉細胞に分布し、同時に、これら細胞と咽頭弓の対応は三叉、顔面、舌咽および迷走神経の各神経節に対応する⁶⁰⁾。この点を今少し具体的にみると、中脳前方部からの神経堤細胞は前頭鼻隆起に、中脳後方部からのそれは上顎隆起

に、中脳後方部のプロロンボメアAからは下顎隆起に、プロロンボメアBからのそれは第二咽頭弓(舌骨弓)に分布する⁶¹⁾。その頭部神経堤細胞の移動経路は、最初は神経管両側の表皮外胚葉下で中胚葉とともに頭蓋顔面部の間葉を疎に構成し、その後、この間葉組織中を背側から腹側に下顎隆起内に向かう。そして、一般の神経堤細胞は末梢神経細胞、神経支持組織、色素細胞、クモ膜、軟膜に分化するのに対し、これらの頭部神経堤細胞は頭蓋顔面骨胚のほとんど、歯の間葉組織を形成することは周知の通りである。

今回のマウス口腔発生の検索は胎生10日から開始したが、その型形成は光顕的には1)原基形成期(胎生10日~胎生12日)、2)成長期(胎生13日~胎生18日)および3)完成期(生後1日以降)の3期に分けることができた。この時期の顎顔面の前頭断の構造は極めて単純で、口窩(腔)粘膜上皮による口裂と上皮下の間葉組織のみで、この時期には、成長因子発現の一例として、下顎隆起正中部の上皮からBMP-4が分泌され、これが*Barx-1*の発現を阻害すると同時に*Msx-1*遺伝子発現を誘導すること、およびFGF-8が*Barx-1*を誘導することが知られている⁶²⁾。しかし今回の観察では、10日胚の口腔領域にはTGF- β 1, TGF- β RI, NGF, NGFR-1, EGFRのみが間葉細胞に検出され、BMP-4やFGF-8は明確には見出せなかった。そして多くの発現物質が一斉に検出されはじめたのは11日胚からであった。11日胚では舌原基、メッケル軟骨を含む各軟骨原基、歯胚原基が生じ、しかもすでに毛細血管や末梢神経線維束が形成されつつあった。さらに12日胚では、口蓋突起、唾液腺原基および顎骨原基が生じた。

このような発生過程における各遺伝子産物の発現性あるいは検出性を全体的に通覧すると、発現物質は①組織特異性を示すものと②非特異性であるもの、③全期間を通じて検出されるものと④不連続性に検出されるものと⑤特定の期間のみに検出されるもの、⑥リガンドとそのレセプターの発現性では、一方のみが発現される時期と⑦両者が同時発現を行う時期があるという7項目にわたる傾向を示した。

この中で、まず組織発生の特徴付けに機能すると考えられるホメオティック遺伝子産物は、胎生11日胚で末梢神経線維に最初に検出され、胎生12日胚ですべての組織細胞に陽性を示し、その発現傾向は①と③の性状を示した。すなわちホメオティック遺伝子産物は口腔発生のほぼ全期間に見出されるものの、Pax-9は主に上皮系細胞(口腔粘膜上皮と歯胚上皮)および筋組織細胞に、これに対してHox-11は神経線維、間葉細胞、軟骨組織細胞、骨組織細胞および歯乳頭細胞に検出され、組織細胞特異性の傾向が強く現れた。ところで、ホメオティック遺伝子産物はすべて61個のアミノ酸から成る共通構造があり、この部分はホメオボックスと名付けられている。マウスのホメオティック遺伝子の

一つである *Hox* は20種類以上のホメオボックス、すなわち *Hox* complex (*Hox-C*) を発現し、マウス胎生12日胚において、後脳のロンボメヤ-4に *Hox B1*, ロンボメヤ-3から後部と *Hox B2* が特異的に発現され、この所見から細胞位置表示に深く関わっていることが示唆され、また、突然変異実験からは、型形成に不可欠な物質であることは明らかであるものの、どのような遺伝子の発現調節を行っているのかは現在のところ不明である¹⁾。一方、*Pax* グループの *Pax-1* は脊椎骨形成、*Pax-3* は筋形成、*Pax-9* は一般の骨形成にそれぞれ関与する。すなわち、*Pax* グループは体節において間葉細胞の骨芽細胞や筋芽細胞への分化を特徴付けるタンパクである^{63,64)}。口腔発生における今回の所見からは、一般的には骨形成に関与するとされている *Pax-9* は⁶⁵⁾ 歯胚上皮および筋芽細胞の特徴付けに、また現在のところ作用が十分に明らかにされていない *Hox-11* は、神経線維、軟骨組織、骨(顎骨)組織への特徴付けにそれぞれ関与すること、ひいては口咽頭弓内において、将来重要な位置を占める臓器・組織の原基形成に深く関わっていることが窺われた。

このようなホメオティック遺伝子による組織発生の特徴付けに続いて、原基の型形成すなわち増殖と分化が開始される。まず口腔発生における細胞増殖についてみると、細胞増殖の指標となるPCNAの発現性は胎生12日胚で著しく、胎生13日および胎生14日胚で減少し、胎生17~18日胚でピークに達するという二相性の発現傾向を示した。元来、細胞増殖はサイクリンに結合することによってキナーゼ活性を高め、G1期からS期への移行を促進するCDK、およびこのサイクリン・CDK複合体に結合し抑制的に作用するCKIの相互作用で行われる⁶⁶⁻⁶⁸⁾が、PCNAはG1期初期とS期に旺盛に合成される分子量36kDaのサイクリンの一種であり⁶⁹⁾、G1期においてサイクリン・CDK複合体に結合し、retinoblastomaタンパク(pRB)のリン酸化を促すことによってS期でのDNA複製を旺盛にする^{70,71)}。今回のPCNAの二相性の発現性において、最初の発現は原基形成のための細胞増殖、後の発現は完成のための細胞増殖に関係することが示唆された。そしてPCNA発現細胞の低下期の胎生13~14日胚においては、増殖よりはむしろ分化が先行することが示唆された。このような増殖および逆の増殖低下には、サイクリン、CDKおよびCK1の発現のいずれかに種々の成長因子が影響を与えていることは明らかで、今回の各成長因子の発現性や検出性の経時的動態をPCNAのそれと比較検討すると、TGF- β ファミリーが増殖抑制性に、また他は促進性に作用することが強く示唆された。すなわち、TGF- β スーパーファミリー全体は①~⑦すべての傾向を示す多様性を示したが、その中のTGF- β ファミリーのみはPCNA発現低下期に一致して検出された。TGF- β スーパーファミリーにはTGF- β , BMP, アク

チビンの各ファミリーの他にMIS, GDF-9, Inhibin α , GDNFが属し⁷²⁾、これらはすべて一旦、前駆体タンパクとして産生された後、カルボキシル末端に近い110-140個のアミノ酸部が切断されて活性型となり、システイン残基の中の7個はすべてに同じ位置に存在して三次元構造を形成し、ペプチドのすべてがダイマー構造をとっている点で共通している⁷³⁾。その中のTGF- β ファミリーは分泌タンパクの一種で、元々TGF α 存在下でラットNRK線維芽細胞の増殖促進因子として見出され⁷⁴⁾、TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3の3種が存在すること⁷⁵⁻⁷⁷⁾、これらは70kDaの膜貫通性タンパク(TGF- β RII)と高い親和性を示すがTGF- β のシグナル伝達はできなく、TGF- β RIは結合性を示さないがTGF- β RIIを活性化することができ^{78,79)}、これらが協調的に働くことによって発生過程の細胞-細胞相互作用の仲介因子として機能することが明らかにされた⁸⁰⁾。そしてTGF- β ファミリーとの結合は、一般には細胞増殖ではなく増殖抑制に作用することも併せて知られるようになった⁸¹⁾。一方、TGF- β スーパーファミリーのBMPファミリーは、TGF- β と同じく、TGF- β RIIとTGF- β RIレセプター複合体を介してそのシグナルを核に送り^{82,83)}、またInhibinは元々内分泌腺から分泌され卵巣刺激ホルモン分泌の調節因子として見出された分子量32kDaのダイマーで、分子量18kDaの α 鎖と14kDaの β 鎖から成り、 β 鎖には β Aと β Bの2種類があり、 α 鎖と β A鎖とから成るものをInhibin A、 α 鎖と β B鎖とから成るものをInhibin Bと名付けられている⁸⁴⁻⁸⁶⁾が、これらBMP群とInhibin α はTGF- β ファミリーとは違って細胞増殖を促進させる。本検索でもこれらは②、④、⑦の傾向を示し、レセプターとの同時発現(検出)は主として胎生12日胚に認められ、このことから原基形成期のほとんどすべての細胞増殖に関連していることが示唆された。

NGFファミリーには、NGF, PDGF, NGFR(1と5)があり、NGFは神経成長因子であって^{87,88)}、そのレセプターのNGFR-1は胎児の背側根グリアで、またNGFR-5は感覚神経細胞と中枢グリア細胞で発現される^{89,90)}。このように発現部位は異なるものの、両者とも分子量140kDaの膜貫通性チロシンキナーゼタンパクである⁸⁹⁻⁹¹⁾。また、PDGFはジスルフィド結合タンパク鎖によってPDGF-AA, PDGF-ABおよびPDGF-BBの三種のアイソフォームがある⁹²⁾が、そのレセプターはトリプシンキナーゼタンパクドメインと酷似し^{93,94)}、両者の結合によってmitogenとして作用し、その機構はオートクリンあるいはパラクリン的に中枢神経系のみならず中胚葉細胞にも及ぶ⁹⁵⁾。今回の検索ではNGFとPDGF-Aはともに②、③の傾向を示し、レセプターとの同時発現は胎生11,12日胚と胎生17,18日胚においてみられ、⑦の傾向を示し、このファミリーもまた原基形成期と完成期前後の組織細胞のすべてに増殖因子と

して作用していることが示唆された。

EGFファミリーのEGFとTGF- α は分子量170kDaの細胞表面糖タンパクのレセプター(EGFR)を共有する^{96,97)}。今回検出したHB-EGFはヘパリン結合性上皮成長因子であり、EGFファミリーの一員としてmitogenの機能を発揮し、EGFR以外に細胞表面の硫酸化プロテオグリカンとも結合する^{98,99)}。マウス口腔発現においてはHB-EGFは多分に①の性状を有し、これに対してTGF- α は②の性状を示し、また、レセプターのEGFRとの同時発現は胎生11, 12日胚および胎生16~18日胚にピークを示す二相性の⑦の傾向を示し、やはり原基形成期と成長期後期に外胚葉性上皮および間葉性細胞のすべてにmitogenとして機能することを示唆した。

FGFファミリーの一員のFGFはFGF-1からFGF-10の10種類が分類され^{100~103)}、またそのレセプターとしてFGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4がある^{104~107)}。これらレセプターは3つの免疫グロブリン様ドメインと膜貫通性チロシンキナーゼドメインなどから成り^{104,105)}、さらにFGFR-1とFGFR-2には変異的スプライシングによって生じるバリエーションがあり、これらは中胚葉性、上皮性および神経性外胚葉性由来の細胞の成長因子として作用する¹⁰⁸⁾。今回の検索では、FGF-8は間葉組織細胞に対してのみ全期間に検出され、レセプターのFGFR-1およびFGFR-2との同時発現は胎生17日胚の間葉、歯乳頭、骨、筋および胎生18日胚の骨の各組織細胞にみられ、①および②の性状が強く現れた。この所見は、FGFファミリーは口腔発生においては骨や筋組織を中心に間葉由来の組織細胞のみに、しかも完成期直前のみ成長因子として作用することが示唆された。

以上のように、今回検出した成長因子は口腔発生原基の成長に対して抑制的あるいは促進的に作用することが示唆されたが、これら物質は一方では分化・誘導因子でもある。頭部誘導は、胚盤胞期において頭部外胚葉下の原始内胚葉(胚盤胞下層)から分泌される成長因子のnodalがまず必須となることがキメラ実験で認められている¹⁰⁹⁾。そして頭部神経管の閉鎖が生じ、これによって頭顔面構造が出現すると同時に、体節から生じる体肢芽などと同様に、整然とした細胞増殖と細胞死(アポトーシス)によって顔面隆起が発生する⁵⁷⁾。従って、口腔の各原基の組織発生に関わる分化には、上皮と間葉との相互作用が重要であることが容易に推測できるが、Lumsden¹¹⁰⁾は*in vitro*の実験系でこの点

を証明している。今回の各成長因子の発現性あるいは染色性を組織毎にみると、口窩(口腔)粘膜上皮、歯胚上皮および腺上皮といった上皮組織系細胞には、FGFファミリーを除いてほぼすべての因子が検出され、支持組織系、筋組織系および神経組織系細胞にはあらゆる因子が検出された。このような所見は、各組織細胞が発生して行く経過において、いずれの細胞にも数多くの分化・誘導因子の影響を受けることを示している。そして、この分化は細胞増殖が一旦低下する時期に一致して行われることが考えられ、このことからTGF- β ファミリーがすべての細胞分化のきっかけを作ることが示唆された。また、個々の組織細胞の分化には、上皮と間葉との相互誘導が重要であるが、その最前線に立つ因子としてBMPファミリーが注目されている。すなわち、BMPは中胚葉を誘導し、さらにこれを起点として骨を始めとして多くの組織を誘導していくことは周知の事実であるが、本検索からは、BMPはとくに胎生12日胚においてすべての組織細胞に検出され、それ以降は胎生17日胚の間葉組織細胞、骨組織細胞、筋組織細胞および神経組織細胞に限局的に見出された。この検出性をみる限り、BMPの誘導作用は胎生12日胚が中心になると考えられた。その誘導の方向は今回の検索からは不明であったが、この点は歯胚についてはよく解明されている。すなわちTuckerら⁶²⁾はBMP-4が下顎隆起正中の上皮から分泌され、Msx-1発現を誘導し、Barx-1発現を阻害することを見出し、さらにNeubuserら¹¹¹⁾は歯胚形成予定部位にPax-9が発現されることを見出し、また、このPax-9の発現には上皮から分泌されるFGF-8が必要であり、同時にBMP-4がその誘導を阻害することも明らかにした。これらの知見は歯胚形成部位がFGF-8とBMP-4の拮抗作用によって決定されることを示している。さらに今回の観察から、歯胚の間葉組織にはTGF- β ファミリー、NGFファミリー、EGFファミリー、FGFファミリーといったすべての成長因子が関わっていることが示唆された。このことは歯胚の型形成にはさらに複雑な遺伝子統御のあることを示している。

以上のように、今回、口腔発生の分化と増殖に関わる発現物質を免疫組織化学的に検出し、その結果、口腔発生に関連するすべての組織細胞の増殖と分化に対して数多くの因子が複雑に関与していることが明らかになった。今後、今回の結果を基にして個々の組織の型形成の分子機構の解明を行って行く次第である。

結 論

胎生10日胚から生後2日にわたるマウスの口腔発生を光顕的および免疫組織化学的に検索し、次の結論を得た。

1. マウス口腔発生は光顕的には原基形成期、成長期、完成期の三期にわたった。

2. 原基形成期は胎生11日胚および胎生12日胚であり、胎生12日胚ですべての原基形成が完了し、胎生13日胚から胎生17日胚が成長期、それ以降は完成期とみなし得た。
3. この全期間に体節の特徴付けに関与するホメオテ

ティック遺伝子産物のPax-9やHox-11が検出された。

4. 細胞増殖の指標の一つであるPCNAの発現は胎生12日胚と胎生17日胚から胎生18日胚にピークのある二相性の発現性を示した。
5. TGF- β スーパーファミリーについては、リガンドとレセプターの同時発現が胎生13日胚～胎生15日胚に限定的であった。
6. NGFファミリーおよびEGFファミリーについては、リガンドとレセプターの同時発現が胎生11日胚～

胎生12日胚と胎生17日胚～胎生18日胚にPCNAと同様の二相性の発現性を示した。

7. FGFファミリーとレセプターとの同時発現は胎生17日胚ならびに胎生18日胚のみに認められた。

以上から、口咽頭弓の発生にもホメオティック遺伝子が関与し、組織発生の特徴付けが行われること、また、原基形成期と成長期後半に細胞増殖が旺盛になり、これには各成長因子が関与すると同時に口腔の各原基の分化・誘導にも機能していることが強く示唆された。

文 献

- 1) 上野直人, 野地澄晴: 新形づくりの分子メカニズム, 実験医学バイオサイエンス, 羊土社(東京), 18~55, 2000.
- 2) Rugh, R The mouse Its reproduction and development Burgess Publishing(Minneapolis), 208~295, 1967.
- 3) Beddington, R S P Induction of a second neural axis by the mouse node *Development*, **120** 613~620, 1994.
- 4) Beddington, R S P and Robertson, E J Anterior patterning in mouse *Trend Genet*, **14**: 277~284, 1998.
- 5) Beddington, R S P and Robertson, E J Axis development and early asymmetry in mammals *Cell*, **96**: 195~209, 1999.
- 6) Ding, Lu Yang, Yu-Ting Yan, Amy Chen, Nishita Desai, Anthony Wynshaw-Boris, Michael, M Cripto is required for correct orientation of the anterior-posterior axis in the mouse embryo *Nature*, **395**: 702~707, 1998.
- 7) Acampora, D, Avantaggiato, V, Tuorto, F, Briata, P, Corte, G, Simeone, A Visceral endoderm-restricted translation of Otx1 mediates recovery of Otx2 requirements for specification of anterior neural plate and normal gastrulation *Development*, **125**: 5091~5104, 1998.
- 8) Johnston, D St and Nusslein-Volhard, C The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo *Cell*, **68**: 201~219, 1992.
- 9) Ferguson, E L and Anderson, K V Localized enhancement and repression of the activity of the TGF- β family member, decapentaplegic, is necessary for dorsal-ventral pattern formation in the Drosophila embryo *Development*, **114**: 583~597, 1992.
- 10) Arora, K and Nusslein-Volhard, C Altered mitotic domains reveal fate map changes in Drosophila embryos mutant for zygotic dorsoventral patterning genes *Development*, **114**: 1003~1024, 1992.
- 11) Ferguson, E L and Anderson, K V Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the Drosophila embryo *Cell*, **71**: 451~461, 1992.
- 12) Wharton, K A, Ray, R P, Gelbart, W M An activity gradient of decapentaplegic is necessary for the specification of dorsal pattern elements in the Drosophila embryo *Development*, **117**: 807~822, 1993.
- 13) Shimell, M J., Ferguson, E L, Childs, S R, O'Connor, M B The Drosophila dorsal-ventral patterning gene tolloid is related to human bone morphogenetic protein 1 *Cell*, **67**: 469~481, 1991.
- 14) Holley, S A, Jackson, P D, Sasai, Y, Lu, B, De Robertis E M, Hoffmann F M, Ferguson, E L A conserved system for dorsal-ventral patterning in insects and vertebrates involving sog and chordin *Nature*, **376**: 249~253, 1995.
- 15) Biehs, B, Francois, V, Bier, E The Drosophila short gastrulation gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm *Genes Dev.*, **10**: 2922~2934, 1996.
- 16) Francois, V, Solloway, M, O'Neill, J W, Emery, J, Bier, E Dorsal-ventral patterning of the Drosophila embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene *Genes Dev.*, **8**: 2602~2616, 1994.
- 17) Francois, V and Bier, E Xenopus chordin and Drosophila short gastrulation genes encode homologous proteins functioning in dorsal-ventral axis formation *Cell*, **80**: 19~20, 1995.
- 18) Schmidt, J, Francois, V, Bier, E, Kimelman, D Drosophila short gastrulation induces an ectopic axis in Xenopus evidence for conserved mechanisms of dorsal-ventral patterning *Development*, **121**: 4319~4328, 1995.
- 19) Harland, R and Gerhart, J Formation and function of Spemann's organizer *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **13**: 611~667, 1997.
- 20) Sokol, S Y Wnt signaling and dorso-ventral axis specification in vertebrates *Curr Opin Genet Dev.*, **9**: 405~410, 1999.
- 21) Levin, M, Johnson, R L, Stern, C D, Kuehn, M, Tabin, C A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis *Cell*, **82**: 803~814, 1995.
- 22) Pagan-Westphal, S M, Tabin, C J The transfer of left-right positional information during chick embryo-

- genesis *Cell*, **93** 25~35, 1998.
- 23) Logan, M, Pagan-Westphal, S M, Smith, D M, Paganessi, L, Tabin, C J The transcription factor Pitx2 mediates situs-specific morphogenesis in response to left-right asymmetric signals *Cell*, **94** 307~317, 1998.
 - 24) Yokouchi, Y, Vogan, K J, Pearse, R V 2nd, Tabin, C J Antagonistic signaling by Caronte, a novel Cerberus-related gene, establishes left-right asymmetric gene expression *Cell*, **98** 573~583, 1999.
 - 25) Meno, C, Saijoh, Y, Fujii, H, Ikeda, M, Yokoyama, T, Yokoyama, M, Toyoda, Y, Hamada, H Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos *Nature*, **381** 151~155, 1996.
 - 26) Meno, C, Shimonono, A, Saijoh, Y, Yashiro, K, Mochida, K, Ohishi, S, Noji, S, Kondoh, H, Hamada, H lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal *Cell*, **94** 287~297, 1998.
 - 27) Adachi, H, Saijoh, Y, Mochida, K, Ohishi, S, Hashiguchi, H, Hirao, A, Hamada, H Determination of left/right asymmetric expression of nodal by a left side-specific enhancer with sequence similarity to a lefty-2 enhancer *Genes Dev*, **13** 1589~1600, 1999.
 - 28) Yoshioka, H, Meno, C, Koshiba, K, Sugihara, M, Itoh, H, Ishimaru, Y, Inoue, T, Ohuchi, H, Semina, E V, Murray, J C, Hamada, H, Noji, S Pitx2, a bicoid-type homeobox gene, is involved in a lefty-signaling pathway in determination of left-right asymmetry *Cell*, **94** 299~305, 1998.
 - 29) Ryan, A K, Blumberg, B, Rodriguez-Esteban, C, Yonei-Tamura, S, Tamura, K, Tsukui, T, de la Pena, J, Sabbagh, W, Greenwald, J, Choe, S, Norris, D P, Robertson, E J, Evans, R M, Rosenfeld, M G, Izpisua Belmonte, J C Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates *Nature*, **394** 545~551, 1998.
 - 30) Lu, M F, Pressman, C, Dyer, R, Johnson, R L, Martin, J F Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development *Nature*, **401** 276~278, 1999.
 - 31) Kitamura, K, Miura, H, Miyagawa-Tomita, S, Yanazawa, M, Katoh-Fukui, Y, Suzuki, R, Ohuchi, H, Suehiro, A, Motegi, Y, Nakahara, Y, Kondo, S, Yokoyama, M Mouse Pitx2 deficiency leads to anomalies of the ventral body wall, heart, extra- and perocular mesoderm and right pulmonary isomerism *Development*, **126** 5749~5758, 1999.
 - 32) Lin, C R, Kioussi, C, O'Connell, S, Briata, P, Szeto, D, Liu, F, Izpisua-Belmonte, J C, Rosenfeld, M G Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis *Nature*, **401** 279~282, 1999.
 - 33) Bisgrove, B W, Essner, J J, Yost, H J Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling *Development*, **126** 3253~3262, 1999.
 - 34) Esteban, C R, Capdevila, J, Aris, N E, Pascual, J, Ángel Ortiz, Carlos, J, Izpisua B The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry *Nature*, **401** 243~251, 1999.
 - 35) Ishimaru, Y, Yoshioka, H, Tao, H, Thisse, B, Thisse, C V, E Wright, C, Hamada, H, Ohuchi, H, Noji, S Asymmetric expression of antivin/lefty1 in the early chick embryo *Mech Dev*, **90** 115~118, 2000.
 - 36) Bryant, P J, Bryant, S V and French, V Biological regeneration and pattern formation *Sci Am*, **237** 66~76, 1977.
 - 37) Nusslein-Volhard, C and Wieschaus, E Mutation affecting segment number and polarity in *Drosophila* *Nature*, **287** 795~801, 1980.
 - 38) Boncinelli, E, Simeone, A, Acampora, D and Mavilio, F Hox gene activation by retinoic acid *Trends Genet*, **7** 329~334, 1991.
 - 39) Johnston, D St and Nusslein-Volhard, C The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo *Cell*, **68** 201~219, 1992.
 - 40) Tabata, T and Kornberg, T B Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs *Cell*, **76** 89~102, 1994.
 - 41) Anderson, K V Pinning down positional information dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo *Cell*, **95** 439~442, 1998.
 - 42) 中野芳朗, Ingham, P W 形態形成とショウジョウハエのセクメントポラリティー遺伝子, 発生・分化から形態形成へ—分子機構と医学への展開. 実験医学, **9** 144~151, 1991.
 - 43) Noden, D M Craniofacial development new views on old problems *Anat Rec*, **208** 1~13, 1984.
 - 44) Hall, B K Development and Evolution of the Neural Crest (Tissue interactions in the development and evolution of the vertebrate head) (Maderson P F), John Wiley & Sons (New York), 1987
 - 45) Hemmati-Brivanlou, A and Melton, D Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise *Cell*, **88** 13~17, 1997.
 - 46) Sasaki, Y and De Robertis, E M Ectodermal patterning in vertebrate embryos *Dev Biol*, **182** 5~20, 1997.
 - 47) Mizuseki, K, Kishi, M, Matsui, M, Nakanishi, S, Sasai, Y *Xenopus* Zic-related-1 and Sox-2, two factors induced by chordin, have distinct activities in the initiation of neural induction *Development*, **125** 579~587, 1998.
 - 48) Kishi, M, Mizuseki, K, Sasai, N, Yamazaki, H, Shiota, K, Nakanishi, S, Sasai, Y Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm *Development*, **127** 791~800, 2000.

- 49) Stemple, D L and Anderson, D J Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest *Cell*, **71** . 973~985, 1992.
- 50) Reynolds, B A and Weiss, S Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system *Science*, **255** 1707~1710, 1992.
- 51) Svenden, C N, Clarke, D J, Rosser, A E, Dunnett, S B Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system *Exp Neurol*, **137** : 376~388, 1996.
- 52) Morrison, S J, White P M, Zock, C, Anderson, D J Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells *Cell*, **96** . 737~749, 1999.
- 53) Lindsell, C E, Boulter, J, diSibio, G, Gossler, A, Weinmaster, G Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development *Mol Cell Neurosci*, **8** 14~27, 1996.
- 54) Myat, A, Henrique, D, Ish-Horowicz, D, Lewis, J A chick homologue of Serrate and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis *Dev Biol*, **174** 233~247, 1996.
- 55) Artavanis-Tsakonas, S, Rand, M D, Lake, R J Notch signaling cell fate control and signal integration in development *Science*, **284** . 770~776, 1999.
- 56) Kimble, J, Henderson, S, Crittenden, S Notch/LIN-12 signaling transduction by regulated protein slicing *Trends Biochem Sci*, **23** . 353~357, 1998.
- 57) Francis-West, P, Ladher, R, Barlow, A and Graveson, A Signalling interactions during facial development *Mech Dev*, **75** 3~28, 1998.
- 58) Matsuo, T, Osumi-Yamashita, N, Noji, S, Ohuchi, H, Koyama, E, Myokai, F, Matuo, N, Taniguchi, S, Doi, H, Iseki, S A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells *Nature Genetics*, **3** : 299~304, 1993.
- 59) Osumi-Yamashita, N, Kuratani, S, Ninomiya, Y, Aoki, K, Iseki, S, Chareonvit, S, Doi, H, Fujiwara, M, Watanabe, T and Eto, K Cranial anomaly of homozygous rSey rat is associated with a defect in the migration pathway of midbrain crest cells *Dev Growth Differ*, **39** 53~67, 1997.
- 60) Osumi-Yamashita, N, Ninomiya, Y, Doi, H and Eto, K Rhombomere formation and hind-brain crest cell migration from prorrhombomeric origins in mouse embryos *Dev Growth Differ*, **38** . 107~118, 1996.
- 61) Osumi-Yamashita, N, Ninomiya, Y, Doi, H and Eto, K The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos *Dev Biol*, **164** 409~419, 1994.
- 62) Tucker, A S, Matthews, K L and Sharpe, P T Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling *Science*, **282** . 1136~1138, 1998.
- 63) Dahl, E, Koseki, H and Balling, R Pax genes and organogenesis *Bioessays*, **19** . 755~765, 1997.
- 64) Terzic, J, Muller, C, Gajovic, S and Saraga-Babic, M Expression of PAX2 gene during human development *Int J Dev Biol*, **42** . 701~707, 1998.
- 65) Peters, H, Neubuser, A, Kratochwil, K and Balling, R Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities *Genes Dev*, **12** : 2735~2747, 1998.
- 66) Xiong, Y, Zhang, H and Beach, D D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA *Cell*, **71** : 505~514, 1992.
- 67) Nakayama, K and Nakayama, K Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors brakes of the cell cycle engine during development *Bioessays*, **20** : 1020~1029, 1998.
- 68) Sherr, C J, Roberts, J M CDK inhibitors positive and negative regulators of G1-phase progression *Genes Dev*, **13** 1501~1512, 1999.
- 69) Waseem, N H and Lane, D P Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) Structural conservation and the detection of a nuclear form *J Cell Sci*, **96** 121~129, 1990.
- 70) Bravo, R, Frank, R, Blundell, P A and MacDonald-Bravo, H Cycline/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta *Nature*, **326** : 515~517, 1987.
- 71) Woods, A L, Hall, P A, Shepherd, N A, Hanby, A M, Waseem, N H, Lane, D P and Levison, D A The assessment of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining in primary gastrointestinal lymphomas and its relationship to histological grade, S+G2+M phase fraction(flow cytometric analysis) and prognosis *Histopathol*, **19** 21~27, 1991.
- 72) Massague, J, Attisano, L and Wrana, J L The TGF- β family and its composite receptors *Trends cell Biol*, **4** : 172~178, 1994.
- 73) 宮園浩平 潜在型TGF- β その構造と多彩な機能. 実験医学, **10** 1839~1844, 1992.
- 74) Sporn, M B, Roberts, A B Transforming growth factor-beta recent progress and new challenges *J Cell Biol*, **119** . 1017~1021, 1992.
- 75) Anzano, M A, Roberts, A B, Smith, J M, Sporn, M B, De Larco, J E Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors *Proc Natl Acad Sci USA*, **80** 6264~6268, 1983.
- 76) Derynck, R, Jarrett, J A, Chen, E Y, Eaton, D H, Bell, J R, Assoian, R K, Roberts, A B, Sporn, M B, Goeddel, D V Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression

- in normal and transformed cells *Nature*, **316** 701~705, 1985.
- 77) ten Dijke, P, Hansen, P, Iwata, K K, Pieler, C, Foulkes, J G Identification of another member of the transforming growth factor type beta gene family *Proc Natl Acad Sci USA*, **85** 4715~4719, 1988.
 - 78) Cheifetz, S, Hernandez, H, Laiho, M, ten Dijke, P, Iwata, K K, Massague, J Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms *J Biol Chem*, **265** 20533~205338, 1990.
 - 79) Wrana, J L, Attisano, L, Carcamo, J, Zentella, A, Doody, J, Laiho, M, Wang, X F, Massague, J TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex *Cell*, **71** 1003~1014, 1992.
 - 80) Massague, J Receptors for the TGF-beta family *Cell*, **69** 1067~1070, 1992.
 - 81) Moses, H L, Yang, E Y, Pietenpol, J A TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation new mechanistic insights *Cell*, **63** 245~247, 1990.
 - 82) Zhang, Y, Feng, X, We R, Derynck, R Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response *Nature*, **383** 168~172, 1996.
 - 83) Liu, F, Hata, A, Baker, J C, Doody, J, Carcamo, J, Harland, R M, Massague, J A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator *Nature*, **381** 620~623, 1996.
 - 84) McPherron, A C, Lawler, A M, Lee, S J Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11 *Nature Genetics*, **22** 260~264, 1999.
 - 85) Stewart, A G, Milborrow, H M, Ring, J M, Crowther, C E, Forage, R G Human inhibin genes Genomic characterisation and sequencing *FEBS Lett*, **206** 329~334, 1986.
 - 86) Massague, J, Cheifetz, S, Igotz, R A, Boyd, F T Multiple type-beta transforming growth factors and their receptors *J Cell Physiol*, Suppl **5** 43~47, 1987.
 - 87) Thoenen, H The changing scene of neurotrophic factors *Trends Neurosci*, **14** 165~170, 1991.
 - 88) Klein, R Role of neurotrophins in mouse neuronal development *FASEB J*, **8** 738~744, 1994.
 - 89) Reinach, F C, MacLeod, A R Tissue-specific expression of the human tropomyosin gene involved in the generation of the trk oncogene *Nature*, **322** 648~650, 1986.
 - 90) Martin-Zanca D, Oskam, R, Mitra, G, Copeland, T, Barbacid, M Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene *Mol Cell Biol*, **9** 24~33, 1989.
 - 91) Martin-Zanca D, Hughes, S H, Barbacid, M A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences *Nature*, **319** 743~748, 1986.
 - 92) Ross, R, Raines, E W, Bowen-Pope D F The biology of platelet-derived growth factor *Cell*, **46** 155~169, 1986.
 - 93) Hart, C E, Forstrom, J W, Kelly, J D, Seifert, R A, Smith, R A, Ross, R, Murray, M J, Bowen-Pope D F Two classes of PDGF receptor recognize different isoforms of PDGF *Science*, **240** : 1529~1531, 1988.
 - 94) Heldin, C H, Backstrom, G, Ostman, A, Hammacher, A, Ronnstrand, L, Rubin, K, Nister, M, Westermark, B Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts evidence for two separate receptor types *EMBO J*, **7** 1387~1393, 1988.
 - 95) Smits, A, Kato, M, Westermark, B, Nister, M, Heldin, C H, Funai, K Neurotrophic activity of platelet-derived growth factor (PDGF) Rat neuronal cells possess functional PDGF beta-type receptors and respond to PDGF *Proc Natl Acad Sci USA*, **88** 8159~8163, 1991.
 - 96) Reynolds, F H Jr, Todaro, G J, Fryling, C, Stephenson, J R Human transforming growth factors induce tyrosine phosphorylation of EGF receptors *Nature*, **292** 259~262, 1981.
 - 97) Hunter, T The epidermal growth factor receptor gene and its product *Nature*, **311** 414~416, 1984.
 - 98) Modjtahedi, H, Dean, C The binding of HB-EGF to tumour cells is blocked by mAbs which act as EGF and TGF alpha antagonists *Biochem Biophys Res Commun*, **207** 389~397, 1995.
 - 99) Mitamura, T, Higashiyama, S, Taniguchi, N, Klagsbrun, M, Mekada, E Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity *J Biol Chem*, **270** 1015~1019, 1995.
 - 100) Moore, R, Casey, G, Brookes, S, Dixon, M, Peters, G, Dickson, C Sequence, topography and protein coding potential of mouse int-2 a putative oncogene activated by mouse mammary tumour virus *EMBO J*, **5** 919~924, 1986.
 - 101) Delli Bovi, P, Curatola, A M, Kern, F G, Greco, A, Ittmann, M, Basilico, C An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the FGF family *Cell*, **50** 729~737, 1987.
 - 102) Zhan, X, Bates, B, Hu XG, Goldfarb, M The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors *Mol Cell Biol*, **8** 3487~3495, 1988.
 - 103) Miyamoto, M, Naruo, K, Seko, C, Matsumoto, S, Kondo, T, Kurokawa, T Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of

- the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property *Mol Cell Biol*, **13** : 4251~4259, 1993.
- 104) Dionne, C A, Crumley, G, Bellot, F, Kaplow, J M, Searfoss, G, Ruta, M, Burgess, W H, Jaye, M, Schlessinger, J Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-reacting with acidic and basic fibroblast growth factors *EMBO J*, **9** : 2685~2692, 1990.
- 105) Mansukhani, A, Dell'Era, P, Moscatelli, D, Kornbluth, S, Hanafusa, H, Basilico, C Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor activation by three members of the FGF family and requirement for heparin *Proc Natl Acad Sci USA*, **89** : 3305~3309, 1992.
- 106) Keegan, K, Johnson, D E, Williams, L T, Hayman, M J Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3 *Proc Natl Acad Sci USA*, **88** : 1095~1099, 1991.
- 107) Holtrich, U, Brauninger, A, Strebhardt, K, Rubsamens-Waigmann, H Two additional protein-tyrosine kinases expressed in human lung fourth member of the fibroblast growth factor receptor family and an intracellular protein-tyrosine kinase *Proc Natl Acad Sci USA*, **88** : 10411~10415, 1991.
- 108) Rifkin, D B, Moscatelli, D Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor *J Cell Biol*, **109** : 1~6, 1989.
- 109) Varlet, I, Collignon, J, Robertson, E J nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation *Development*, **124** : 1033~1044, 1997.
- 110) Lumsden, A G Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ *Development*, **103** : 155~169, 1988.
- 111) Neubuser, A, Peters, H, Balling, R, Martin, G R Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways a mechanism for positioning the sites of tooth formation *Cell*, **90** : 247~255, 1997.
-

Expression Pattern of Homeotic-and Growth-associated Gene Products on the Organogenesis of Mouse Oral Region

RUMIKO MORIKAWA¹⁾, KATSUYUKI OHTOMO²⁾, MOTOHIKO NAGAYAMA¹⁾
and HIROSHI TAKEUCHI¹⁾

¹⁾ Department of Oral Pathology, Asahi University School of Dentistry
(Chief Prof Hiroshi Takeuchi)

²⁾ Department of Surgery, Asahi University School of Dentistry

Key words Oral organogenesis, Branchial arches, Homeotic gene product,
Differentiating-growth factor

Abstract Light microscopic examination revealed that mouse oral organogenesis in the branchial arches is divided into three processes, the gene formation phase (11–12-day-old embryos), the germ growth phase (13–17-day-old embryos) and organ establishment phase (on and after day 18 of embryonic development). Immunohistochemical study clarified that homeotic gene products which help give specificity of somite to certain cells in the embryo, Pax-9 and Hox-11 are expressed in almost cells in the branchial arches during all phases in this investigation. PCNA indicating proliferation of cells was characterized by an expression pattern showing two peaks, one at 12 days and another at 17–18 of embryonic growth. A similar expression pattern to PCNA was observed in the simultaneous expression of the ligands and receptors of NGF and EGF families, and the same tendency of FGF family could be observed in the EGF family at 17–18-day-old. In contrast, the expression peak of TGF-beta superfamily was limited to 13–15-day-old embryo.

These results indicated that cell proliferation in the branchial arches is promoted by expression of the NGF, EGF and FGF families, and suppressed by TGF-beta superfamily. And it was suspected that TGF-beta superfamily influence cell differentiation to regulate organogenesis in the oral region.